Versuche über Kulturen von Malariaparasiten.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

in der

Medizin, Chirurgie und Geburtshilfe

der

Hohen medizinischen Fakultät der Universität Marburg

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

vorgelegt von

Julius Brandt
aus Biedenkopf.

MARBURG
Buchdruckerei von Joh. Hamel
1919.

Angenommen von der medizinischen Fakultät Marburg
am 9. Juli 1919.

Gedruckt mit Genehmigung der Fakultät.

Referent: Geheimrat Prof. Dr. Bonhoff.

Die Malaria ist eine der wenigen Erkrankungen, die nach Mitteilungen zuständiger Stellen der Heeresverwaltung eine immer größere Ausbreitung unter den Heeresangehörigen genommen hat. Im ersten Kriegsjahr wurde bei 0,16‰ Krankenzugängen, im dritten Kriegsjahr bereits bei 4,2‰ Krankenzugängen Malaria festgestellt. Diese Zunahme ist umso beachtenswerter, als sich bei den meisten anderen Erkrankungen ein Rückgang bemerkbar machte.

Als Truppenarzt eines, in den Baltaniederungen am unteren Sereth in Rumänien eingesetzten Bataillons, mußte ich mich vorwiegend der Beobachtung und Behandlung Malariakranker widmen. Meist handelte es sich um Malaria tertiana, Malaria tropica beobachtete ich nur vereinzelt, Malaria quartana garnicht. Außerordentlich häufig aber waren eben die Erkrankungen an Malaria tertiana, die weit über die Hälfte meines Truppenteils befiel, davon waren eine große Anzahl Rückfälle.

Da, trotzdem alle zur Verfügung stehenden Mittel, Chinin per os und intramuskulär, Chinin-urethan und Neosalvarsan angewandt wurden, die Zahl der rückfällig erkrankten Patienten nicht zurückging, erschien es höchst wünschenswert, zu untersuchen, woran es lag, daß die Therapie einer so lang bekannten Krankheit so wenig, was Dauerheilung anbetraf, zu leisten vermochte. Untersuchungen über die Wirkung des Chinins im menschlichen Körper wurden abgebrochen, und ich folgte einem Hinweis von Herrn Geheimrat Bonhoff, als ich daran ging, der Frage der Kultivierung des Malariaparasiten näherzutreten. Gelang es, den Malariaparasiten zu züchten, wie es angeblich dem Amerikaner Bass gelungen war, so wäre es möglich geworden, die dem Parasiten zuträglichsten Bedingungen zu-

nächst festzustellen, dann die wirkungsvollste Methode seiner Bekämpfung zu erforschen.

Die primitiven Verhältnisse, unter denen ich mich der Aufgabe unterzog, erschwerten die Arbeiten erheblich. Die notwendige Apparatur mußte ich mir selbst zusammenstellen, auch war mir die bis dahin erschienene Literatur nicht zugänglich, ich mußte deshalb vieles selber suchen, was, wie sich nachträglich herausstellte, bereits von anderen Untersuchern veröffentlicht war.

Bereits zahlreiche Forscher haben sich der Arbeit, der Züchtung der Malariaparasiten, gewidmet. Was sie erreicht haben, soll zunächst chronologisch zusammengestellt werden, hieran anschließend folgen die von mir angestellten Untersuchungen, dann die Besprechung der gemachten Beobachtungen in Beziehung zu den Resultaten derjenigen Bearbeiter, die sich der gleichen Aufgabe bisher gewidmet haben.

I. Teil.

Literaturauszüge.

Bereits 1890 ist es angeblich Sacharoff (Nr. 49) gelungen, die Malariaparasiten in eingefrorenen Blutegeln während einer Woche am Leben zu erhalten. Nach Sacharoffs Angabe will auch Rosenbach im Blutegelblut nach 48 Stunden lebende Plasmodien festgestellt haben.

Im gleichen Jahre hat auch Plehn (Nr. 42) in einem zwischen Paraffinum liquid. aufgefangenen Blutstropfen eines an Malaria tertiana Erkrankten, unter Verwendung des geheizten Objekttisches, bei einer Temperatur von 37° und 41° C die Parasiten beobachtet und 2—3 Tage am Leben erhalten. Plehn glaubt sogar, bei den extraglobulär gelegenen Parasiten Geißelbildung beobachtet zu haben.

Die Parasiten in Blutegeln zu züchten, hat auch Blumer (Nr. 11) versucht. Die Parasiten zeigten aber bald keine amöboide Beweglichkeit mehr.

Nach Bass' Angaben haben sich auch Hamburger, Rosenbach und Mitchel derselben Aufgabe mit dem Erfolg gewidmet, daß es ihnen gelang, Malariaparasiten einige Tage im Blutegelblut zu erhalten.

1891 ist es Coronado (14) angeblich gelungen, die Malariaparasiten sogar aus dem Wasser zu züchten.

Sacharoff berichtet 1893 erneut über seine 1890 begonnenen Kultivierungsversuche, da dieselben verschiedentlich, unter anderen von Plehn, angezweifelt worden waren. An Malaria-tropica-Kranken ließ er Blutegel saugen. Nach 4 Tagen nahm er an sich mit 0,25 ccm infiziertem Blutegelblut einen Impfversuch vor, der zur Erkrankung an Malaria bei ihm führte. Nach 7 Tagen führte ein abermaliger Impfversuch nicht mehr zur Infektion, obwohl die Malariaparasiten

noch lebend waren, d. h. amöboide Beweglichkeit zeigten. Bei einem Malaria tertiana-Fall waren z. Zt. der Blutentnahme alle Stadien der Parasitenentwicklung vorhanden, nach 48 Stunden hatten jedoch die jungen pigmentlosen Plasmodien ihre amöboide Beweglichkeit noch erhalten, während die großen Parasitenformen sie verloren hatten.

Kubarow (25) hat sich 1895 vergeblich bemüht, die Erreger der Malaria-Erkrankungen zu züchten.

Dagegen gelang es Hamburger (21), bereits vor 1897 die Bildung von beweglichem Pigment in vorher unpigmentiert gewesenen Malaria tropica-Parasiten außerhalb des menschlichen Körpers nachzuweisen.

Laveran (26) hat 1898 die Malariaparasiten während 10 Tagen im hängenden Tropfen zu konservieren versucht, ohne jedoch nachweisen zu können, daß sie sich weiter entwickelt hätten, noch daß sie am Leben geblieben wären.

In demselben Jahre hat Ziemann (62) Malariaparasiten während 24 Std. konserviert, ebenfalls ohne eine Weiterentwicklung bei den 3 Formen der Malaria feststellen zu können.

Auch von Thayer (56) 1901 mitgeteilte Untersuchungen über angeblich gelungene Kulturversuche mit Malariaerregern haben keine Bestätigung erfahren.

1902 will Schaudinn (49) das Eindringen der Sichelkeime (Sporozoiten) in Erythrocyten unter Anwendung des geheizten Mikroscoptisches beobachtet haben.

Nach Bass hat sich auch Miller mit Kultivierungsversuchen befaßt. Nachprüfungen seiner Experimente haben jedoch keine Resultate ergeben.

Der Vollständigkeit halber sei hier erwähnt, daß Nocht (34) bei Gelegenheit anderer Untersuchungen im Leichenblut Malariaparasiten vorfand, die alle in der gleichen Entwicklungsphase sich befanden, d. h. im Stadium der Teilung. Nach Nochts Meinung handelt es sich um eine postmortale Weiterentwicklung.

Im Jahre 1911 erschien die erste Mitteilung von Bass

(Nr. 2), in der er über neue Gesichtspunkte in der Immunitätslehre; ihre Anwendungen bei Kulturen von Protozoen und Bakterien berichtete. (Bass Nr. 2.) Es folgten bald darauf (Bass Nr. 3) Berichte über gelungene Kulturversuche nach den bereits erwähnten Grundsätzen, und zwar soll die Kultivierung der drei Malariaformen gelungen sein, eine Kultur z. Zt. der Berichterstattung bereits 3 Wochen am Leben sein. Die angewandte Technik gibt Bass erst genauer in einer Veröffentlichung von 1912 (Nr. 4) bekannt.

Bass' Technik der Malariaparasiten-Kultur.

Verfasser entnimmt mit einer 20 ccm Glasspritze aus der Ellbogenvene 1—2 Stunden, nachdem der Malariakranke etwas gegessen hat und etwa 3—4 Stunden, bevor die Sporulation eintritt, das Blut mit Hülfe einer nicht zu engen Kanüle.

Das Blut wird in einen schräggehaltenen 2,5 cm weiten Glaszylinder vorsichtig ausgespritzt. Mit einem bis auf den Bodeu dieses Zylinders reichenden Glasstab wird unter gleichzeitigem Watteverschluß des Zylinders vorsichtig defibriniert.

Zu je 10 ccm Blut werden $^1/_{10}$ ccm 50% Dextroselösung (Merck, Darmstadt) hinzugefügt. In den Kulturröhren soll die Blutsäule 2,5—5 cm betragen.

Sollen jedoch Subculturen angelegt werden, dann muß zentrifugiert werden, aus der Mittelschicht der Blutsäule werden $^1/_{10}$—$^2/_{10}$ ccm Blut entnommen und in eine neue Kulturröhre übertragen, das Blutserum in einer Höhe von 12—25 mm hierauf geschichtet.

Besser soll es jedoch sein, in ein Reagenzglas einen Glastubus einzuführen, auf diesen eine Scheibe von weißem Filtrierpapier aufzulagern und hierauf die $^1/_{10}$—$^2/_{10}$ ccm Blut aufzuschichten. Ueber diesem Filtrierpapier soll die Serumsäule mindestens 12 mm hoch stehen, das Filtrierpapier selbst soll 12 mm von dem Boden der Kulturröhre entfernt sein. Besser als der erwähnte Glastubus wäre eine Blut-

säule, die durch, sofort nach der Blutentnahme vom Menschen stattgehabte Centrifugierung bis zur Gerinnung, gewonnen würde.

Die Kulturröhren werden in eine Brutschranktemperatur von 40—41° C verbracht. Diese Temperatur hält die Bildung von Komplement hintan nnd zerstört möglicherweise vorhandenes Komplement in 15—30 Minuten. Das Verbringen der Kulturröhren in diese Brutofentemperatur stellt also nach Bass' Angaben gleichzeitig einen Inaktivierungsproceß dar.

In der obersten Blutsäulenschicht wachsen die Parasiten dann in einer Schichtdicke von 1—5 mm.

Das Centrifugieren ist angeblich nötig, um eine Phagocytose durch die Leukocyten zu vermeiden, indem die Leukocyten nach dem Centrifugieren abpipettiert werden. Besonders bedrohen diese Leukocyten die ausschlüpfenden Merozoiten, was bei Subculturen zu berücksichtigen wäre.

Subculturen legt Bass alle 48 Stunden an, indem er zu 5 Teilen Nicht-Malaria-Erythrocyten 1 Teil Malaria-Erythrocyten der Kultur hinzufügt. Diese Ueberimpfung wird 4—5 Stunden vor der maximalen Segmentation vorgenommen.

Mit der angeführten Technik ist es nun angeblich Bass gelungen, den Parasiten der Malaria trop. 29 mal, den der Malaria quartana 1 mal, den der Malaria tertiana 6 mal erfolgreich zu züchten. Einmal sollen die Parasiten bis zur 4. Generation in vitro am Leben erhalten worden sein unter Anwendung der erwähnten Subculturtechnik, d. h. unter anderem durch Hinzufügen von immer frisch entnommenen Nicht-Malaria-Blut zu den Kulturmedien. Einmal will Bass aber auch das Wachstum dreier Generationen in vitro beobachtet haben, ohne daß Frischblut hinzugefügt worden war.

Nähere mikroscopische Befunde der Bass'schen Kulturversuche teilt Ziemann (s. Literatur unten Nr. 63), dem Bass seine Präparate übersandte, mit. Es handelt sich um Perniciosa Präparate.

Nach 5 1/2 Stunden waren die Parasiten der Kultur 1/6—1/7 Erythrocyten groß.

Nach 16 Std. hatten die Parasiten Siegelringform angenommen, das Chromatin der Kerne begann sich aufzulockern.

„ 21 „ zeigeu die $^1/_5$—$^1/_4$ erwachsenen Parasiten feine Pigmentierung.

„ 30 „ sind die Parasiten $^1/_4$—($^1/_2$) erwachsen das Pigment wird dunkler und beginnt sich zusammenzuballen. Das Chromatin, das an Volum zugenommen hat, beginnt sich aufzulockern und zeigt primitive Mitose resp. Kernabschnürung.

„ 40 „ Beginn der Schizogonie, stellenweise ist sie bereits vollendet.

„ 48 „ sind die Parasiten $^1/_3$—$^1/_2$—$^2/_3$ Erythrocyten groß

„ 48 „ „ „ „ $^1/_2$—$^2/_3$ „ „

Das Chromatin der Merozoiten ist 1 μ groß. Es findet sich eine Zusammenklumpung vieler Parasiten enthaltender Erythrocyten die sog. Agglommeration nach Ziemann, Agglutination nach Bass.

„ 68 „ erscheint die Mehrzahl der Parasiten abgestorben.

Gabbi (18), der sich ebenfalls Kulturversuchen der Malariaparasiten widmete, führte seine Versuche nicht zu Ende.

Kultivierungsversuche von Sinton (53) verliefen ergebnislos. Letzterer konnte nur unter Anwendung der Basschen Technik eine Conservierung der Malariaparasiten in vitro bis zum Eintritt der Hämolyse, jedoch keine Vermehrung feststellen. Auch auf Novy-Mac Neal-Nicollschem Nährboden wurde bei allen Malariaparasitenformen kein Erfolg erzielt. Thomson (57) und Mc. Lellan berichten 1912 über Nachuntersuchungen der Bassschen Angaben. Sie modifizierten die Technik von Bass etwas, indem sie das Blut nur mit einer Kanüle entnahmen, ohne eine Saugspritze zu verwenden, auch setzten sie zu je 8 ccm Blut $^1/_{10}$ ccm 50% Dextroselösung hinzu und verbrachten die Kulturröhren in eine Brutofentemperatur von 38° C.

Kultur I. Malaria tropica.

Blutbild z. Zt. der Blutentnahme: Parasiten sind 3 μ groß, enthalten kein Pigment. Teilungsformen sind nicht vorhanden.

Nach 12 Std. Parasiten enthalten Pigment und sind 5—6 μ groß.

„ 25 „ Zahlreiche 2—30 kernige Teilungsfiguren von 7—8 μ Größe.

„ 27 „ sind nur noch wenig Teilungsformen vorhanden.

„ 66 „ sind alle Parasiten degeneriert.

Kultur II. Malaria tropica. Dieser Kulturversuch gelang nur zum Teil, weil Pat. Chinin genommen hatte. Nach 7 Std. waren die Parasiten in der Kultur gewachsen, nach 18 Std. zeigten sich einige verfrühte Teilungsfiguren, außerdem eine Zusammenklumpung der von Parasiten befallenen Erythrocyten. Es war keine weitere Fortentwicklung feststellbar.

1913 teilen A. G. Gurko und K. E. Hamburger (20) Kulturversuche mit. Sie verfahren nach Bass' Vorschrift, defibrinieren und zentrifugieren, fügen jedoch ca. die 4 fache Dextrose-Menge, nämlich $^1/_{10}$ ccm der 50% Dextrose-Lösung zu $2\,^1/_{10}$ ccm Kulturblut hinzu. Bei Subculturen wurde ebenfalls die erhöhte Dextrose-Menge angewandt, im übrigen das Mischungsverhältnis von Malaria-Erythrocyten: Nicht-Mal. E. = 1 : 5 (wie Bass) angewandt. Die Brutofentemperatur betrug 39° C.

Kultur I. Malaria tropica.

Blutbild z. Zt. der Blutentnahme vom Pat.: Ringformen und Halbmonde.

Nach 15 Std. Neben Ringformen und Halbmonden sind Teilungsformen vorhanden. Hiervon wurde eine Subcultur angelegt. Diese zeigt nach 24 Std. zahlreiche Merozoiten. Abermals angelegte Subcultur zeigt wieder nach 24 Std. kleinste Merozoiten und Gameten.

N. M. Joukoff (23) (Russisch Schukow) schlug ein

erster Kulturversuch mit Bass' Technik fehl. Sie wurde deshalb modifiziert, indem zu 2,5 ccm Venenblut 0,5 ccm einer 10% Natriumcitricum-Lösung zur Aufhebung der Gerinnung hinzugefügt wurden. Ein Teil der Kulturröhren wurden bei 41°, ein andrer Teil bei 44° C. Brutofentemperatur während ½ Std. gehalten. Später wurden die Kulturröhren, bei einer Temperatur von 25—26°, einer ähnlichen Temperatur, der auch die Anopheles-Mücke ausgesetzt ist gehalten.

Kultur I. Mal. trop.

In den bei 44° gehaltenen Tuben blieben keine Parasiten am Leben. Dagegen will Verfasser in den anfangs 41° C. erwärmten, später bei 25—26° gehaltenen Kulturröhren die Parasiten während dreier Tage am Leben erhalten und den Cyklus der geschlechtlichen Fortpflanzung, d. h. Befruchtung, Ookinetenbildung u. s. w., beobachtet haben. Von einer Weiterentwicklung der ungeschlechtlichen Parasiten erwähnt Verfasser nichts.

Kultur II. Plasmodium Malariae.

Auf die Erythrocytensäule wurde 1,5—2 ccm v. Lockes Flüssigkeit aufgeschichtet.

Verfasser will auch in dieser Kultur am 6. Tage der Kultur Geschlechtsformen in Gestalt von Sporozoiten, außerdem aber auch Conjugation beobachtet haben.

Lavinder (27) hat nach Bass' Vorschrift in die Kulturröhren einen Glastubus verbracht und eine Brutofentemperatur von 40° C. angewandt.

Kultur. Malaria tropica.

Die Parasiten entwickelten sich bis zur Sporulation. Die Merozoiten befielen jedoch keine neuen Erythrocyten. Eine Kultur von Malaria quartana Parasiten mißlang.

1913 berichten H. da Rocha-Lima und H. Werner (43), ausführlich, über Kulturversuche unter Anwendung der Bassschen Technik.

Kultur I. Malaria tropica.

In der 24 Std. alten Kultur hatten sich die ursprünglich

kleinen bis mittelgroßen Ringe, die unpigmentiert waren, zu voll erwachsenen Schizonten mit dicken Pigmentklumpen und zu Teilungsformen weiterentwickelt.

Nach 72 Stunden waren die meisten Parasiten abgestorben.

Eine nach 24 Std. angelegte Subcultur, die nach Bass' Vorschrift auf eine während der Centrifuzierung zur Gerinnung gebrachte Blutsäule, aufgelagert worden war zeigte keine Fortentwicklung.

Kultur II. Malaria tropica.

Nach 24 Sfunden entwickeln sich pigmenthaltige Schizonten, sonst ist keine Weiterentwicklung feststellbar. In Kontrollröhren, in denen sich kein Dextrose-Zusatz befand, entwickelten sich weniger pipmenthaltige Schizonten als in den Röhren mit Dextrose-Zusatz. Bei den Kulturen, die mit Dextrose-Zusatz versehen, bei Zimmertemperatur gehalten wurden, ließ sich nur bei wenigen Schizonten ein Anfang von Weiterentwicklung feststellen; ohne Dextrosezusatz blieb auch diese Weiterentwicklung aus.

Im Eisschrank gehaltene Kulturen zeigten mit und ohne Dextrosezusatz keinerlei Weiterentwicklung, lebten aber noch nach 72 Stunden.

Eine Subcultur mißlang.

Kultur III. Malaria trop.

Zur Zeit der Blutentnahme werden 50 Stück junge Schizonten gezählt.

Nach 17 Std. wurden 4 junge Schizonten, 34 Stück erwachsene, pigmenthaltige Schizonten, 12 Stück Teilungsformen festgestellt.

„ 24 „ sind keine jungen Schizonten mehr vorhanden, wieder 34 Erwachsene und 16 Teilungsformen.

„ 48 „ 4 erwachsene Schizonten, 6 Teilungsformen und 40 abgestorbene Parasiten.

„ 64 „ sind alle Parasiten abegestorben.

Eine Subcultur verlief resultatlos.

Kultur IV. V. Mal. trop. mißlang.

Kultur VI. Mal. trop.

Blutbefund z. Zt. der Blutentnahme: 50 kleine, mittelgroße und große Tropenringe ohne Pigment.

Nach 24 Std. 13 unpigmentierte Tropenringe.
14 pigmentierte Parasiten.
23 Teilungsformen.

„ 48 „ 2 unpigmentierte Parasiten
20 pigmentierte „
16 Teilungformen.
12 abgestorbene Parasiten.
Außerdem wurde reichliche Phagocytose beobachtet.

„ 72 „ Parasitenzahl nimmt ab, und es läßt sich von dieser Stunde ab keine Weiterentwicklung mehr feststellen.
Eine Subcultur ging nicht an.

Kultur VII. Malaria trop. mißlang.

Kultur VIII. Malaria trop. Nach 24 Stunden läßt sich in der Kulturröhre der Beginn der Sporulation feststellen, darüber hinausgehend jedoch keine Weiterentwicklung, weder in der ursprünglichen Kultur noch in der angelegten Subcultur.

Kultur IX. Malaria tertiana.

Blutbefund z. Zt. der Blutentnahme: 5 junge Schizonten, 40 erwachsene Schizonten, 5 Teilungsfiguren.

Nach 18 Std. 4 Junge Schizonten, 6 erwachsene Schizonten, 32 Teilungsfiguren, 8 abgestorbene Parasiten,

„ 24 „ Fast nur Teilungsfiguren.

„ 48 „ Nur abgestorbene Formen.

Eine Subcultur ging nicht an.

Kultur X. Mal. tert. Nachdem zunächst im Blut z. Zt. der Blutentnahme keine Teilungsformen vorhanden waren, fanden sich solche Formen nach 24 stündiger Kultur.

Edmund und Et. Sergent, Béguet und Plantiez (52) entnehmen zu Kulturzwecken das Blut in eine mit Glaswoll-

fäden beschickte Flasche und defibrinieren dadurch, daß die Flasche zwischen den Händen gerollt wird. Zu 10 ccm Blut fügen sie 0,2 ccm einer 50% Dextroselösung. Die Leukocyten wurden nicht entfernt, und das Serum wurde nicht inaktiviert.

Kultur I. Mal. tropica.

Blutbild z. Zt. der Entnahme. Schizonten $^1/_6$ erwachsen ohne Pigment.

Nach 15 Std. Schizonten $^2/_6$ Erythrocytengröße mit Pigment. Hiernach keine Weiterentwicklung, trotzdem Patient kein Chinin erhalten hat.

Kultur II. Malaria tropica.

Blutbild z. Zt. der Entnahme: Schizonten $^3/_4$ erwachsen, mit Pigment.

Nach 15 Std. Schizonten sind ganz erwachsen, Teilungsformen, Jungformen, von denen ein Teil in neue Erythrocyten eingedrungen ist.

Trotzdem auch dieser Pat. kein Chinin erhielt, ließ sich hiernach keine Weiterentwicklung mehr feststellen.

Kultur III. Malaria trop. Pat. erhielt Chinin. Die Schizonten vergrößern sich geringgradig in der Kultur. Einige entwickeln sich zu Teilungsformen. Hiernach keine Weiterentwicklung.

J. G. Thomsonn, D. Thomson, und Fautham (59) haben das Kulturblut z. Zt. des Anfalls entnommen und nach ihrer Angabe wenig mehr Dextrose angewandt als Bass.

Kultur I. Malaria tertiana. Pat. wurde nicht mit Chinin behandelt. Brutschranktemperatur 39° C.

Blutbild z. Zt. der Blutentnahme: 85% junge Ringformen 15% $^3/_4$ erwachsene Formen, wenig Gametocyten.

Nach 19 Std. 3% junge Ringformen, 17% $^1/_4$ erwachsene, 70% halberwachsene bis dreiviertelerwachsene Parasiten. 10% befanden sich kurz vor der Teilung.

„ 33 „ Die Mehrzahl der Parasiten ist dreiviertel erwachsen.

„ 45 „ sind 80% kleine Ringe, 20% 1/2—3/4 erwachsene Schizonten vorhanden.

Kultur II. Malaria tertiana.

z. Zt. der Blutentnahme sind 96% junge, 4% halberwachsene Ringe vorhanden.

Nach 8 Std. 4% junge, 80% 1/4 erwachsene, 16% 3/4 erwachsene Ringe und wenig Teilungsformen vorhanden.

„ 29 „ sind 89% Jungformen, 8% dreiviertel erwachsene Ringe und wenig Teilungsformen vorhanden.

Es wurde nicht beobachtet, daß z. Zt. der Sporulation eine Tendenz zur Zusammenklumpung von Malariaparasiten behafteten Blutkörperchen bestand, wie solche bei Malaria tropica beobachtet wurde.

Erneut berichtete J. G. Thomson und D. Thomson (60) 1913 von Kulturversuchen bei Malaria-tropica-Fällen. Sie wandten Brutofentemperaturen von 37—41° C. an, hielten sich an die von Bass angegebene Technik, zentrifugierten jedoch nicht und entfernten somit nicht die Leutrocyten, auch inaktivierten sie das Blutserum nicht. Trotzdem auch kein frisches Blut zu den Kulturen hinzugefügt wurde, wollen die Verfasser 12 mal mit Erfolg den Parasiten der Malaria tropica, davon einmal bis in die 4. Generation gezüchtet haben.

Kultur III. Malaria tropica.

Blutbild z. Zt. der Blutentnahme: kleine 3 μ große Ringe in nicht vergrößerten Erythrocyten.

Nach 36 Std. beginnt das Chromatin sich zu teilen.

„ 47 „ Anzahl der Meroziten wächst.

„ 52 „ ist der Höhepunkt der Teilung erreicht.

„ 75 „ sind keine Teilungsformen, dagegen junge Schizonten von 1,5 μ Größe vorhanden.

„ 3 Tagen zeigt dieselbe Kultur abermals Sporulationsformen in geringerer Anzahl.

Nach 4 1/2 Tagen sind nur junge Ringe vorhanden.
„ 6 „ wieder Teilungsformen.
„ 7 „ nur junge Ringe (angebliche 4. Generation).
„ 8 u. 9 „ abermals Teilungsformen.
„ 10 „ nur junge Ringe.

Kultur IV. Malaria tertiana.

z. Zt. der Blutentnahme waren nur junge Parasitenformen, keine Teilungsformen vorhanden.
„ 20—29 Std. zeigten sich Sporulationsformen.

In 2 weiteren Fällen soll die Kultur ebenfalls gelungen sein.

Ziemann (64) entnimmt das zur Kultur bestimmte Blut einige Stunden nach dem Anfall, am besten, nachdem der Patient einige Stunden vorher etwas gegessen hatte. Beim Einlaufen des Blutes in den Glaszylinder ist darauf zu achten, daß das Blut nicht viel mit Luft in Berührung kommt. Ein Teil des Blutes wurde defibriniert, einem Teil wurde zur Aufhebung der Gerinnung Natrium citricum, und zwar zu je 10 ccm Blut 0,3 ccm einer 2 % Lösung hiervon hinzugesetzt. Im übrigen wurden Bass' Vorschriften befolgt, nur daß später eine größere Menge Dextrose angewandt wurde, als sie Bass vorschreibt. Das Blutserum wurde 1 Stunde lang auf 45° C. erwärmt, um es zu inaktivieren, die Leukocytenschicht wurde von der Blutsäule abpipettiert. Die Brutofentemperatur betrug 37° wurde vor der Zeit der Kernteilung auf 40° C. gesteigert.

Kultur I. Malaria tertiana mißlang wegen Bakterienwachstum. Eine Weiterentwicklung konnte festgestellt werden.

Kultur II. Mal. tert. Die Parasiten entwickeln sich von 2/3 Erythrocytengröße und von Erwachsenen zu Sporulationsformen und angeblich in der 2. Generation, die minder zahlreich war, wieder bis zur Sporulation und anschließender Bildung neuer Schizonten.

Kultur III. Malaria tropica (duplicata).

z. Zt. der Blutentnahme waren in dem peripheren Blut kleine bis 1/2 erwachsene Ringe und wenig Halbmonde. In der sechs Tage alten Kultur ließ sich eine Vermehrung der

Gameten, wie auch der andern Parasitenformen feststellen. Sporulationsformen wurden in der Zwischenzeit ebenfalls beobachtet. Von den angelegten Subculturen gelangen sowohl die, die von der zwei Tage alten Kultur, wie auch solche, die von der 4 Tage alten Kultur angelegt waren.

Kultur IV. Von demselben Patienten wie Kult. III., als im peripheren Blut spärliche kleine Ringformen, aber ziemlich viele Gametenformen vorhanden waren. Sogar noch nach 7 Tagen gelang es, mehrfache Sporulation zu finden, jedoch war es seltener der Fall, wohl weil der Patient bereits Chinin genommen hatte.

Eine erneut angelegte Kultur V von demselben Patienten ließ „prachtvolle" Sporulation erkennen, die 24 Stunden später eintrat, als die Sporulation im Patientenblut erfolgte.

In den folgenden Veröffentlichungen von Ziemann (Z.'s 2., 3. u. 4. Veröffentlichung) Nr. 65 und 66 verteidigt er seine Schlüsse gegen Einwendungen von da Rocha-Lima und bringt noch Angaben über die oben angeführte Kultur V, in der nach 43 Std. abermals Sporulationsformen aufgetreten wären. Nach 52 Stunden wären spärliche junge endoglobulär gelegene Parasiten vorhanden gewesen, nach 60 Std. die Kultur durch Bakterienwachstum vernichtet worden.

Martini (31) hielt sich bei seinen Kulturversuchen an die Basssche Technik, d. h. er fügte zu je 10 ccm Blut 0,1 ccm einer 50% Dextroselösung hinzu, defibrinierte und bewahrte die Kultur im Brutschrank bei 40° C. auf.

Bei einem Falle von Malaria tropica, Kultur I, der mit Chinin behandelt war, wurde eine Kultur mit dem Erfolg angelegt, daß die Parasiten für 4 Tage konserviert wurden, ohne daß eine Weiterentwicklung bei ihnen feststellbar gewesen wäre.

Kultur II. Malaria tropica.
Zur Zeit der Blutentnahme fanden sich mittelgroße Ringe.
Nach 15 Std. bildet sich Pigment.
„ 20—23 Std. zeigen sich Sporulationsformen, die die

Neigung zur Zusammenklumpung zeigen. Ihr Pigment ist blockartig.

„ 26 Std. sind kleinste, intraglobulär gelegene Tropica-Parasiten nachweisbar.

„ 39—42 Std. beginnen die Leukocyten Pigment zu führen, hiernach läßt sich in der Kultur keine Weiterentwicklung mehr feststellen.

Kultur III. Malaria tertiana duplicata.

Chininbehandlung ist der Blutentnahme vorausgegangen.

Z. Zt. der Blutentnahme: ½ bis ganz erwachsene Schizonten und Gameten.

Nach 1 Std. zeigten sich bereits Teilungsformen und vereinzelte intraglobulär gelegene jüngste Schizonten.

„ 2 Std. ist die Sporulation allgemein.

„ 24 Std. sind nur noch Degenerationsformen, pigmentführende Leukocyten und Makrogameten vorhanden.

Von hier ab ist in der 3. Kultur keine Fortentwicklung mehr feststellbar.

In einer letzten Malaria tropica Kultur IV trat bald Degeneration der Parasiten ein, und es kam zu keiner Weiterentwicklung, weil die Brutofentemperatur 43° C. betragen hatte.

Nocht (34) hat gelegentlich bei anderen Versuchen im defibrinierten Blute von Malaria tropica-Kranken, durch das ein Kohlensäurestrom hindurchgeleitet worden war, eine Weiterentwicklung der Malariaparasiten „in vitro“ als Zufallsbefund erhoben. Von welchem Stadium der Entwicklung bis zu welchem sich die Parasiten entwickelt hatten, sagt Nocht leider nicht. Nochts Beobachtungen am Leichenblut wurden bereits erwähnt.

Pepper und Miller (37) haben sich ebenfalls mit der Kultivierung der Malaria tropica-Parasiten unter Verwendung der Bassschen Technik befaßt und nach ihrer Angabe dieselben Resultate wie Bass und Johns erzielt, trotzdem bei ihnen die Leukocyten nicht aus dem Kulturblut entfernt

wurden. Nähere Angaben über ihre Befunde bringen die Verfasser nicht.

Im Gegensatz zu Bass verwandte Perekropoff (38) die 4fache Dextrosemenge und inaktivierte ½ Stunde bei 41° C. und ½ Stunde bei 42° C. Ueberimpfungen, d. h. die Anlage von Subculturen und die Blutentnahmen zu Kulturzwecken wurden 5—6 Stunden nach dem Anfall vorgenommen, möglichst 2—3 Stunden nach dem Essen. Auch zu dem frischen Kulturblut bei den Subculturen wurde 0,4 ccm einer 50% Dextrose- oder Maltose-Lösung hinzugefügt. Das Mengenverhältnis zwischen Parasitenerythrocyten und Normal-Erythrocyten bei den Ueberimpfungen verhielt sich wie 2 : 3. Centrifugiert wurde nicht wegen der Gefahr der Beschädigung der Erythrocyten. Das Komplement des verwandten Serums wurde jedoch durch Erwärmung auf 55—56° C. vernichtet. Die Brutschranktemperatur betrug 41° C.

Kultur I. Malaria tropica.

Nach 4 Stunden war eine Größenzunahme feststellbar, das Pigment war feinkörnig verteilt. Junge Gametenformen wurden beobachtet.

„ 10 Std. waren die Parasiten ⅓—½ Erythrocyten groß, d. h. 2—3 μ groß. Das Pigment hat zugenommen.

„ 13 Std. ballt sich das Pigment zusammen.

„ 17 Std. Parasiten ½—⅔ erwachsen. Das Chromatin lockert sich auf, die Kernteilung beginnt nach dem Princip der successiven Zweiteilung. Kleine Gametenformen sind vorhanden.

„ 21 Std. schnürt sich Protoplasma zur Merozoitenbildung ab.

„ 24 Std. sind die Parasiten ⅔ erwachsen, d. h. 4—5 μ groß. Die vorhandenen Merozoiten sind kaum 2 μ groß. Bei den letzteren verhält sich die Protoplasmamasse zur Masse des Kerns wie $\frac{1}{1}$ Männliche und weibliche Gameten wachsen

bis zur Größe von 10 μ heran und wandern aus den Erythrocyten aus.

Nach 25 Std. zeigen mehrere Erythrocyten eine mehrfache Infektion.

„ 27 Std. Beginn der Gameten-Kopulation. Beginn der Ookinetenbildung.

„ 30 Std. zeigt das mikroscopische Bild wieder das Bild wie zur Zeit von 10—13 Std., nur sind außerdem Ookineten, Oocysten vorhanden, und es beginnen sich Sporocysten zu bilden.

„ 36 Std. füllen die Oocysten die Erythrocyten zur Hälfte aus. Die vorhandenen Schizonten beginnen zu degenerieren.

„ 40 Std. beginnen die Oozysten und die Sporocysten zu bersten.

„ 43 Std. wandern die Sporozoiten in neue Erythrocyten ein (Dieser Vorgang ist auch durch Schaudinn beobachtet und beschrieben worden). Die Schizonten entwickeln sich daneben weiter in zweiter Generation bis zur Schizogonie.

Die Parasiten erlangten eine Gesamtlebensdauer von 133 Stunden, nach welcher Zeit sie degenerierten.

Pitschugin (40) entnimmt das Blut zur Kultur auf der Höhe des Fiebers, nachdem der Patient vorher etwas gegessen hat, im übrigen verfährt er nach der Bassschen Versuchsanordnung, d. h. er setzt die gleiche Menge Dextrose zu, defibriniert, centrifugiert und verbringt die Kultur in eine Brutofentemperatur von 40° C.

Kultur I. Malaria tertiana.

Zur Zt. der Blutentnahme sind junge, halberwachsene Schizonten vorhanden. Die Erythrocyten zeigen Schüffner'sche Tüpflung.

Nach 7 Std. waren in den nicht centrifugierten Kulturröhren verschiedene Entwicklungsstadien der Malariaparasiten, auch Teilungsformen vorhanden.

Nach 24 Std. sind neben zugrunde gehenden Parasitenformen auch Merozoiten vorhanden.

„ 34 Std. ist öfter eine Mehrfachinfektion von Erythrocyten feststellbar.

„ 56 Std. sind nur noch Degenerationsformen vorhanden.

Von der 24 Stunden alten Kultur wurde eine Subcultur angelegt, indem zu einem Teil Parasiten-Erythrocyten 5 Teile frische Erythrocyten vom Gesunden hinzugefügt wurden.

Nach 24stündiger Kulturzeit (= 48 nach der Blutentnahme) sind bereits zahlreiche Degenerationsformen und nur wenig halb und ganz erwachsene Parasiten feststellbar. Die Kulturparasiten erscheinen kompakter als die des peripheren Blutes.

„ 48 Std. (68 Std. nach der Blutentnahme) sind neben vielen abgestorbenen Parasiten auch wenig junge Schizonten nachweisbar.

Hiervon wurde erneut eine Subcultur angelegt.

Nach 10 Std. Kulturzeit werden wenig Teilungsformen,

„ 27 Std. wenig Merozoiten, die sich in Erythrocyten befanden, gefunden.

„ 48 Std. (116 Std. nach der Blutentnahme) waren nur noch Degenerationsformen vorhanden.

Noch zweimal wurden bei demselben Patienten ähnliche Blutkulturen angelegt, mit fast den gleichen Resultaten wie die berichteten Kulturen.

Ein bei einem Malaria tertiana Erkrankten unternommener Kulturversuch II führte unter Anwendung der oben erwähnten Technik zu dem ähnlichen Erfolg.

Bei einem letzten Falle von Mal. tertiana, Kultur III, wird der Blutbefund zur Zeit der Entnahme nicht mitgeteilt, ein Vergleich mit dem nach 6 Std. und 24 Std. erhobenen Befund ist deshalb nicht möglich. An jedem zweiten Tag wurden Subculturen angelegt, trotz der somit erfolgten Verdünnung der Kulturmedien ist es angeblich noch nach

14 Tagen gelungen, 2 kleine Ringe in dem Subculturblut aufzufinden.

Ziemann berichtet in seiner 5. Veröffentlichung (Nr. 66) wieder über Malaria Parasiten-Kulturversuche. Und zwar wurde eine Röhre mit, eine andere nicht mit Dextroselösung beschickt. Das Blut wurde ½ Stunde nach einem Anfall dem Patienten entnommen. Es wurde defibriniert, das Serum inaktiviert.

Malaria tertiana Kultur:

Z. Zt. der Blutentnahme waren Ringe verschiedener Größe, auch Gameten vorhanden.

Nach 21 Std. wurde der Beginn der Sporulation festgestellt.

„ 30 Std. waren die Parasiten z. Teil degeneriert.

In den Kulturröhren, in die keine Dextrose verbracht worden war, war kaum eine Weiterentwicklung festzustellen, vielmehr setzte bald die Degeneration ein.

II. Teil.

Eigene Untersuchungen.

Bei einem eignen Kulturversuch wandte ich folgende Technik an: Einem, an Malaria tertiana erkrankten, Soldaten entnahm ich mit Hülfe einer weiten Strauss'schen Kanüle aus der gestauten Ellbogenvene, nachdem die Entnahmestelle desinfiziert worden war, ca. 25 ccm Blut. Durch ein, an die Kanüle armiertes, kurzes Gummischlauchstück wurde das Blut in eine schräg gehaltene, etwa 50 ccm fassende Flasche geleitet. An der Wand dieser, mit Glasperlen beschickten, Flasche floß das Blut auf den Boden der Flasche, ohne daß dabei Luftblasen erzeugt wurden. Die Flasche wurde mit einem Korkstopfen verschlossen, hierüber wurde eine ausgekochte Stanniolkapsel gestreift, um den Rand der Oeffnung während des Rollens beim Defibrinieren steril zu erhalten. Das Schütteln der Flasche wurde wegen der Gefahr der Luftbeimengung zum Blute vermieden. Das defibrinierte Blut wurde in Mengen von je 5 ccm in Kulturröhren verbracht, zu je 5 ccm Blut wurde 0,1 ccm einer 50% Merckschen Dextroselösung hinzugefügt. Ein Teil der Kulturröhren wurde zentrifugiert, die von Bass erwähnte obere Leukocytenschicht jedoch nicht entfernt. Die Brutofentemperatur betrug 37° C.

Der Patient, 25 Jahre alt, gibt an, noch nie an Malaria erkrankt gewesen zu sein, bisher noch kein Chinin genommen zu haben. Der Patient hatte angeblich am 25. V. 18 8^{00} p. m., 27. V. 18 4^{30} p. m. und 29. V. 18 7^{00} a. m. starken Schüttelfrost. Seine Körpertemperatur betrug am 29. 40,4° am 30. 35,9°, 35,3°, am 31. 40,3°, 39,9°, 37,4° und am 1. VI. 36,1.

Blutbefund:

	Blut-Entnahme Tag	Std.	extraglobulär gelegener Merozoit	eben in Erythrocyten eingedrungener Schizont	$^1/_8$ Erythrocyten großer Schizont	$^1/_4$ Erythrocyten großer Schizont	$^1/_2$ Erythrocyten großer Schizont	$^3/_4$ Erythrocyten großer Schizont	$^1/_1$ = vollständig erwachsener Sch.	Gamet	Sporulationsform = Teilungsform	Rest einer Teilungsform Merozoiten sind ausgeschlüpft
	31.5.	9^{00}		12%	36%	30%	12%	2%			6%	2%
	31.5.	4^{30}		1%	2%	34%	54%	9%				
Anlage der Kultur	2. 6.	11^{00}	nur zugrunde gehende Parasiten. Starkes Bakterienwachstum.									

Wegen des mangelhaften Verschlusses der Kulturröhren trat bald Bakterienwachstum ein, das die Kultur vernichtete.

Ein anderer Kulturversuch schlug fehl, wohl weil das entnommene Blut $^1/_4$ Stunde transportiert werden mußte, bevor die Dextroselösung hinzugefügt werden konnte und die Kulturröhren dadurch erst spät in den Brutofen verbracht wurden. Die Schizonten gingen bald zu Grunde, nur die Gametenformen hielten sich einige Zeit scheinbar unverändert.

Der nächste Kulturversuch wurde mit dem Blute eines, an Malaria tertiana erkrankten, 27 Jahre alten, Russen vorgenommen, der angab, noch nie Malaria gehabt zu haben. Patient hat angeblich kein Chinin genommen. Er will am 26. 6. 1918 etwa um $6^{\underline{15}}$ p. m., am 28. 6. um $6^{\underline{00}}$ a. m. Schüttelfrost gehabt haben.

Seine Temperatur betrug am 28. 6. 40^0, $37{,}6^0$, am 29. 6. Kulturanlage um 4^{30} p. m., Temperatur: 37,3, 38,8, $39{,}3^0$, 1,2 gr. Chinin, 30. 6. $38{,}9^0$, $37{,}6^0$, 0,9 gr. Chinin, 1. 7. $36{,}5^0$, $37{,}1^0$, 1,2 gr. Chinin, 2. 7. 36,2, $36{,}3^0$, 0,9 gr. Chinin.

Die Kulturtechnik war die ähnliche wie bei dem ersten Kulturversuch. Nachdem am 28. 6. das Blutbild des peripheren Blutes festgestellt worden war, wurde am 29. 6. 18

nachmittags 4^{30} das Kulturblut entnommen. Weil jedoch bei der Sterilisation der 50% Dextroselösung früher beim Auskochen in einem Reagenzglas über einer Spiritusflamme ein unkontrollierbarer Teil des Lösungswassers dampfförmig entwich, wurde bei diesem und den folgenden Versuchen die Dextroselösung in Glasphiolen eingeschmolzen. Diese Ampullen wurden dann mit den Blutentnahmeinstrumenten im strömenden Dampf sterilisiert. Zentrifugiert wurde ein Teil der Kulturröhren und zwar 5 Minuten lang bei 800 Umdrehungen der Centrifuge pro Minute. Die Leukocyten wurden nicht entfernt. Zentrifugiert wurde nur zu dem Zwecke, das Mengenverhältnis der Parasiten in der oberen und tiefen Schicht festzustellen, auch um das Verhalten der Leukocyten zu untersuchen. Der Verschluß der Kulturröhren mit sterilem Stopfen und Kapsel blieb derselbe wie in den früheren Versuchen. Die Kulturröhren wurden aufrecht stehend in den Brutofen verbracht, dessen Temperatur entsprechend der Körpertemperatur des Patienten auf 38^0 C. eingestellt wurde. Die Brutofentemperatur wurde in der Nacht auf 40^0 C. gesteigert, weil der Patient ebenfalls fieberte, dann entsprechend der fallenden Körpertemperatur des Patienten am folgenden Tage dem 30. 6. auf 37^0 eingestellt. Auf dieser Höhe wurde sie belassen.

Zur Untersuchung und zur Auszählung der gefundenen Parasitenformen wurden vorwiegend Dünnausstriche benützt, die mit May-Grünwald'scher Farblösung ½ Minute vorgefärbt und fixiert wurden. Diese Farblösung wurde mit destilliertem Wasser, dem auf 50 ccm je 1 Tropfen 10% Sodalösung zugesetzt worden war, abgespült. Auf das feuchte Präparat wurde Grüblers Giemsa Farblösung in der Verdünnung von 1 Tropfen auf 1 ccm dest. Wassers (mit demselben Sodazusatz wie bereits erwähnt) aufgegossen, ohne filtriert worden zu sein. Die Färbedauer betrug je nach der Tagestemperatur ½ bis 1 Stunde. Diese Farblösung wurde ebenfalls mit der Aqua dest.-Sodalösung abgespült.

Das Blutbild ist, nach Procenten berechnet, aus der folgenden Tabelle ersichtlich:

	Blut-Entnahme Tag	Std.	extraglobulär gelegener Merozoit	eben in Erythrocyten eingedrungener Schizont	1/8 Erythrocyten großer Schizont	1/4 Erythrocyten großer Schizont	1/2 Erythrocyten großer Schizont	3/4 Erythrocyten großer Schizont	1/1 = vollständig erwachsener Sch.	Gamet	Sporulationsform = Teilungsform	Rest einer Teilungsform Merozoiten sind ausgeschlüpft
	28.6.	5^{00}	%	4	12	35	38	8	3			
	29.	4^{30}	%			9	24	53	14			
Anlage der Kultur	30.	10^{30}	38	3					3		36	20
	30.	6^{40}	In Degen.						In Auflösung begriffen			
	1.7.	2^{40}							nur Degenerationsformen			

Das Blutbild vom 28. 6. 18 5^{00} p. m. war ein einheitliches, denn es handelte sich um eine, bis dahin nicht mit Chinin behandelte, Erstinfektion von Malaria tertiana. Die prozentuale Beteiligung der verschiedenen Parasitenstadien wurde durch Auszählen an mehreren Ausstrichpräparaten festgestellt, was ja bei dem peripheren Blut weniger wichtig ist, als an den folgenden Blutkulturpräparaten, die möglicherweise in verschiedenen Blutschichten ganz differente Bilder hätte ergeben können. Die, von einem Malariaparasiten befallenen, Erythrocyten zeigten Schüffner'sche Tüpflung, gegenüber den nicht infizierten roten Blutkörperchen waren sie außerdem vergrößert und abgeblaßt. Es wurden auch Erythrocyten beobachtet, die ebenfalls getüpfelt waren, jedoch keinen Parasiten beherbergten, auch gegenüber den Normalerythrocyten nicht vergrößert und nicht abgeblaßt waren. Auf ca. 30 normale Parasitenerythrocyten kam ein Erythrocyt mit Tüpflung ohne sichtbaren Parasiten.

Ein dreiviertel erwachsener Parasit zeigt bereits im Gegensatz zu den meisten Parasiten gleicher Größe Chromatinauflockerung. Die Gestalt des Chromatinkernes ist nicht mehr rund und punktförmig, sondern unregelmäßiger und im Chromatin sind helle Stellen sichtbar. Bei anderen Parasiten war das Chromatin an die Peripherie gelagert, manche Parasiten dieser Größe enthielten auch feinkörniges, über den ganzen Parasiten verteiltes, hellbraunes Pigment.

Am 29. 6. 18, 4^{30} p. m. wurde abermals von dem Patienten eine Blutprobe entnommen. Zu dieser Zeit zeigte ein $^1/_2$—$^3/_4$ erwachsener Parasit eine Protoplasmaabschnürung. Das Blutbild hatte sich in den $11^1/_2$ Stunden derart geändert, daß, wie aus der schematischen Tabelle hervorgeht, auf der die Prozentzahlen angegeben wurden, sich die ursprünglich in der Hauptsache $^1/_4$—$^1/_2$ erwachsenen Parasiten zu $^3/_4$ erwachsenen Formen weiterentwickelt hatten. Zu dieser Zeit wurde die Kultur nach oben beschriebener Technik angelegt. Zur Zeit der Blutentnahme war weder eine Teilungsform, noch ein Merozoit, noch ein ganz jugendlicher, endoglobulär gelegener Schizont im Blute sichtbar. Zu dieser Zeit findet sich ein nicht abgeblaßter Erythrocyt, dessen Parasitenkern stark aufgelockert ist und den vierten Teil des Erythrocyten einnimmt. Die sonst roten Schüffnerschen Tüpfel erschienen in diesem Falle mehr gelb-braun. Ein andrer Parasit zeigte neben der normalen Chromatinauflockerung eine erhebliche Pigmentbildung. Zu gleicher Zeit konnte ich aber auch ganz erwachsene Parasiten beobachten, die kein Pigment enthielten, andere, in denen es ganz feinkörnig verteilt vorhanden war.

Am 30. 6. 18, um 10^{30} a. m. wurde aus der Kulturröhre Blut zur Untersuchung entnommen. Die Auszählung ergab, daß jetzt fast nur Sporulationsformen, bei der Teilung zurückgebliebene Eryfhrocytenhüllen sog. Sporulationskörper, aus denen alle Merozoiten bereits ausgeschlüpft waren, und Merozoiten vorgefunden wurden. Diese Formen, die früher überhaupt nicht im peripheren Blutbild am 28. und 29. 6. 18 vorhanden waren, machten jetzt 94% der Gesamtparasiten-

zahl aus. Die Morulaformen waren in allen Stadien vertreten. Ich fand solche mit 2 bis zu solchen mit 16 Kernen, alle Uebergangszahlen waren vertreten. Nachdem sich zunächst das Chromatin geteilt hatte, umgaben sich diese Chromatinkerne später mit Protoplasma. Viele der Merozoiten bestanden nur aus einem roten Punkt, während die meisten auch das blaue Plasma erkennen ließen. Nur sehr wenige, scheinbar eben erst in den Erythrocyten eingedrungene jüngste Schizonten waren vorhanden. Ein Merozoit war gerade im Begriff, in einen Erythrocythen einzudringen. Es schien als ob der Merozoit zu diesem Zwecke Protoplasmafortsätze ausgestreckt hätte, von denen zwei Fortsätze die vom Erythrocyten gebildete empfängnishügelartige Ausbuchtung umflossen hätten, während ein dritter Fortsatz in den Erythrocyten eindrang. Der Kern lag außerhalb und war durch eine feine helle Zone von dem Parasitenplasma getrennt. Auch zwischen Erythrocyten und Parasitenplasma war eine hellere Zone zu erkennen. Der Erythrocyt war weder vergrößert noch aufgehellt und zeigte keinerlei Tüpflung. Neben diesen scheinbar lebensfähigen Parasitenformen waren einige Degenerationsformen sichtbar, bei denen das Plasmablau bereits vollständig verschwunden war, das Chromatin eine erhebliche Größenzunahme und unregelmäßigere Gestaltung aufwies. Einzelne Leukocyten ließen phagozitierte Parasitenreste erkennen.

Am 30. 6. 18, 6^{40} p. m. fanden sich in dem Kulturblut, ohne daß Bakterienwachstum eingetreten wäre oder sonst dafür ein Fehler in der Versuchsanordnung haftbar hätte gemacht werden können, nur noch degenerierende Parasiten und bereits degenerierte Formen. Ein am 1. 7. 18 entnommenes Präparat zeigt ebenfalls nur Degenerationsformen.

Russe ♂, 23 Jahre, an Malaria tertiana erkrankt. Patient hat vor seiner Lazarettaufnahme Chinin genommen in nicht mehr festzustellender Dosis.

Seine Temperatur betrug am 5. 7. 18 36,4, 36,8, 39,7°,

am 6. 7. 36,5, 36,6°, am 7. 7. 36,9, 36,7, 37,1, 36,6, 37°, am 8. 7. 36,7, 37,1, 36,7, 37,1, 36,7°. 1,2 gr. Chinin.

Patient gibt an am 3. 7. 18 nachmittags Schüttelfrost gehabt zu haben. Das Blutbild ist in dem hierunter gezeichneten Schema eingetragen.

	Blut-Entnahme Tag	Std.	extraglobulär gelegener Merozoit	eben in Erythrocyten eingedrungener Schizont	1/8 Erythrocyten großer Schizont	1/4 Erythrocyten großer Schizont	1/2 Erythrocyten großer Schizont	3/4 Erythrocyten großer Schizont	1/1 = vollständig erwachsener Sch.	Gamet	Sporulationsform = Teilungsform	Rest einer Teilungsform Merozoiten sind ausgeschlüpft
	5.7.	6^{30}		4	26	50	12				2	6
	6.7.	8^{00}					Fast nur vorhand.					
Anlage der Kultur	7.7.	8^{30}	Nur degenerierte erwachsene Parasiten									

Während das am 5. 7. 18 um 6^{30} p. m. entnommene Blut keine Besonderheiten erkennen ließ, höchstens eine Doppelinfektion zur Beobachtung kam, wurde am 6. 7. bei den im peripheren Patientenblut befindlichen Parasiten öfter das Fehlen der roten Kerne, sowie Einziehungen des Parasitenplasmas festgestellt. Inwiefern es sich hierbei um Einwirkungen des eingenommenen Chinins handelt, wird später untersucht werden.

Am 7. 7. 18 blieb trotz gehäufter Temperaturmessung die erwartete Steigerung bei dem, nicht mit Chinin behandelten, Patienten aus. Von dem Patientenblut wurde deshalb am 7. 7. 18 ein Abstrich gemacht, dessen Untersuchung ergab, daß nur noch ganz spärlich die Parasiten in denselben Phasen, wie sie das Blutbild vom 5. 7. gezeigt hatte, vorhanden waren. Außerdem fanden sich Gameten.

Einen ganz ähnlichen Fall habe ich später noch einmal zur Beobachtung bekommen. Ich hatte bei einem an Malaria tertiana-Rückfall leidenden Kranken das Blut zweimal

hintereinander untersucht und die regelmäßige Fortentwicklung der Parasiten festgestellt. Zur erwarteten Zeit blieb jedoch der Fieberanfall aus, ohne daß diesmal Chinin genommen worden wäre. Die Anlage der Kultur unterblieb.

Um festzustellen, ob nun vielleicht trotz des Ausbleibens des Fieberanfalles in dem oben erwähnten Falle, evtl. in den Kulturröhren die Sporulation erfolgt wäre, wurde am 8. 7. 18 7^{30} eine Blutprobe der Kultur untersucht. Sowohl in den defibrinierten Blutproben, wie auch in den mit Natrium citricum versetzten, war keine Weiterentwicklung, sondern im Gegenteil eine starke Degeneration zu beobachten.

Bei einem an Grippe erkrankten 24jährigen Soldaten trat im Anschluß daran ein Malaria tert. Recidiv auf.

Die Temperatur betrug bei Grippe am 7. 7. 1918 $39{,}5^0$, am 8. 7. 37,4, $37{,}8^0$, am 9. 7. 37,5, $37{,}9^0$, am 10. 7. 36,8, $36{,}8^0$, am 11. 7. 36,3, $37{,}4^0$; am 15. 7. 36,1, 36,2, $37{,}8^0$, am 16. 7. 36, 38,2, 40,4, (Malariarecidiv) $39{,}9^0$, am 17. 7. 36,3, 36,6, 37,4, 40,4, $39{,}8^0$, am 18. 7. 36,8, 36,6, 37^0.

Am 17. 7. 18 3^{40} p. m. wurde die Anlage der Kultur vorgenommen. Leider war keine Dextrose vorhanden. Im Uebrigen wurde die bereits erwähnte Technik eingehalten.

	Blut-Entnahme Tag	Std.	extraglobulär gelegener Merozoit	eben in Erythrocyten eingedrungener Schizont	1/4 Erythrocyten großer Schizont	1/4 Erythrocyten großer Schizont	1/2 Erythrocyten großer Schizont	3/4 Erythrocyten großer Schizont	1/1 = vollständig erwachsener Sch.	Gamet	Sporulationsform = Teilungsform	Rest einer Form Merozoiten sind ausgeschlüpft
	17.7.	3^{40}			4	62	25	9				
Kultur-anlage	18.7.	9^{15}		vorhanden	Sonst nur Degenerationsformen							

Nach einer Kulturzeit von 29½ Stunden ließen sich im Kulturblut in der Hauptsache nur zu Grunde gehende Parasitenformen nachweisen. Auch die aufgefundenen Morulaformen befinden sich im Stadium der Degeneration.

Die 16 Merozoiten zeigten verschiedene Größe und waren ungleich intensiv gefärbt. Auch war kein Protoplasma um die einzelnen Kerne gruppiert. Das dabei liegende Pigment schützt vor dem Verdacht, daß es sich um zusammengeballte Blutplättchen handeln könne. Im Kulturblut fand sich ein jüngster Schizont, jünger als die, die vorher im peripheren Blute gefunden wurden, und unter den $^1/_8$ erwachsenen Parasiten im Schema eingereiht worden sind.

Bei einem andern Patienten wurde am 13. 9. 18 im Anschluß an einen Fieberanstieg das Blut untersucht und vorwiegend junge Parasitenformen gefunden. Nächst diesen waren Gameten ziemlich reichlich vertreten. Es sollte eine Kultur angelegt werden, deshalb erhielt der Patient kein Chinin. Infolge der körperlichen Ruhe verschwanden die Parasiten vollständig aus dem peripheren Blutkreislauf und der erwartete Anfall blieb, trotz der nicht eingeleiteten specifischen Behandlung, am 14. 9. 18, aus.

Die Temperatur betrug am 12. 9. 18 41,4, 40,5°, am 13. 37,5, 37,9. 36,2, 36,7°, am 14. 37,5, 36,8, 37,3, 36,6°, am 23. 9. 18, 10 h. a. m. Schüttelfrost, am 24. 36,1, 36,8°, 12^{00} p. m. Sch., am 25. 39,9, 40,1, 38,4, 37,1°, 3 × 0,3 Chinin, am 26. 36,6, 37,2, 36,6, 37,4°, 3 × 0,3 Chinin, am 27. 3 × 0,3 Chinin.

Am 23. 9. 18 trat um 10 h. a. m. erneut ein Schüttelfrost bei demselben Patienten auf. Am darauf folgenden Tage, dem 24. 9. 18, 9^{00}, wurde das Blut wieder untersucht und in der Hauptsache halberwachsene Tertiana-Parasiten gefunden. Vereinzelte Parasiten enthalten wenig gelb-braunes Pigment. Erythrocyten mit Doppelinfektion wurden beobachtet.

	Blut-Entnahme Tag	Std.	extraglobulär gelegener Merozoit	eben in Erythrocyten eingedrungener Schizont	$^1/_8$ Erythrocyten großer Schizont	$^1/_4$ Erythrocyten großer Schizont	$^1/_2$ Erythrocyten großer Schizont	$^3/_4$ Erythrocyten großer Schizont	$^1/_1$ = vollständig erwachsener Sch.	Gamet	Sporulationsform = Teilungsform	Rest einer Form Merozoiten sind ausgeschlüpft
	13.9.	10^{00}	3	57	14	3			2	21		
	24.	9^{00}		4	4	12	48	24	4	4		
	24.	$7^{\underline{00}}$	1	1	2	9	26	51	10			
Anlage der Kultur	25.	12^{00}		4	2	4		8	48		32	
	26.	3^{20}		Nur noch Degenerationsformen. Im Subculturblut ein normaler Merozoit.								
	3.10.	4^{00}		Nur noch vereinzelte Pigmenthaufen.								

An demselben Abend $7^{\underline{00}}$ hatten sich die Parasiten meist zu $^3/_4$ erwachsenen Formen weiterentwickelt. Bei den ganz Erwachsenen zog sich manchmal das Pigment zusammen auf einen Haufen. Das Chromatin zeigte neben Auflockerung in Einzelfällen bereits Zweiteilung.

Zu dieser Zeit wurde die Kultur angelegt, bei der, wie oben beschrieben, verfahren wurde. Defibriniert wurde diesmal mit einem sterilen Glasstäbchen. Die Kulturröhren wurden, teils mit einer Gummischutzkappe versehen, in ein auf 40° C. erwärmtes Wasserbad verbracht. Leider ließ sich die Temperatur nicht gut auf der gleichen Höhe halten, sie schwankte im Laufe der Tage zwischen 33° C. und 40° C. Es wurden verschiedene Kulturröhren hergerichtet.

Kulturröhre Nr.	An 50% Dextrose wurde hinzugef.	An 10% Natr. citr. wurde hinzugel.	Menge des entnommen. Blutes	Verhalten des Serums am	Farbe etc.	Verschluß
1	0	0,36 ccm	10 ccm	26. 9. 18	milchig opal gelb-grünlich	Watte
2	0,1 ccm	0,18 ccm	5 ccm	26.	schwächer opal als R. 1.	„
3	0,1 ccm	0,18 ccm	5 ccm	26.	wie Röhre 2	Gummikappe
4	0,1 ccm	keine, es wurde defibriniert	5 ccm	26.	schwach getrübt schwach rötlich gelb braun	Watte
5	0,1 ccm	„	5 ccm	26.	nur ganz wenig getrübt	Gummikappe

Die Gerinnung in Röhre 1—3 wurde durch Zusatz von 10% Natriumcitricumlösung verhindert. Das Blut der Röhren 4 und 5 wurde defibriniert.

Das aus der Kulturröhre Nr. 1 am 25. 9. 18 entnommene Blut zeigte, ohne daß Bakterienwachstum eingetreten wäre, charakteristische Zerfallsformen der mit Parasiten behafteten roten Blutkörperchen, während die nicht infizierten Erythrocyten unverändert erschienen. Eine Weiterentwicklung „in vitro“ war nicht feststellbar, desgleichen nicht bei den Präparaten, die aus Kulturröhre Nr. 2 entnommen wurden. Hier waren zwar die Zellgrenzen der infizierten Erythrocyten erhalten, die Kerne der Parasiten hingegen verschwommen. Die Leukocyten führen selten Pigment. Kulturröhre 3 zeigt dasselbe Bild wie Röhre Nr. 2.

In der Kulturröhre Nr. 4 hatten sich die meisten Parasiten von $^1/_2$—$^3/_4$ erwachsenen Formen zu vollerwachsenen und Teilungsformen entwickelt. Auch einzelne Merozoiten, außerhalb von Erythrocyten also liegend, waren sichtbar. Die Sporulationsformen zeigten meist 2—7 Kerne. In der Kulturröhre Nr. 5 zeigte sich dasselbe Bild. Sporulations-

formen, d. h. Morulaformen im Endstadium der Teilung habe ich nicht aufgefunden.

Am 25. 9. 18, 4^{00} p. m., wurde mit dem Blute aus Kulturröhre Nr. 5 eine Subcultur angelegt. Zu diesem Zwecke wurde von einem nicht mit Malariaparasiten behafteten Patienten etwas Blut entnommen, defibriniert, mit Dextrose versetzt und zentrifugiert. Aus der Tiefe des zentrifugierten Gesundblutes wurden 0,75 ccm Blut entnommen, mit 0,25 ccm Blut aus der oberen Schicht der Kulturröhre Nr. 5 vermischt und in eine Kulturröhre Nr. 6 verbracht. Ueber diese Blutmischung wurde 1,2 ccm Blutserum des Gesunden geschichtet, die Röhre mit Wattepfropf verschlossen in das Warm-Wasserbad verbracht. Eine Kontroll-Subcultur wurde auf eine, während der Zentrifugierung des Gesundblutes entstandene Blutsäule, wie es Bass empfahl, aufgelagert und ebenfalls mit Blutserum des Gesunden überschichtet = Kulturröhre 7.

Am 26. 6. 18, 3^{30}, sind in der Kulturröhre 4 nur noch Degenerationsformen und Pigment führende Leukocyten nachweisbar, in der Kulturröhre 2 überhaupt keine Parasiten mehr aufzufinden. In beiden Röhren sind keine Bakterien vorhanden.

In dem Blutpräparat, das aus Kulturröhre 5 angefertigt wurde, finden sich ebenfalls nur Degenerationsformen der Parasiten und der nichtinfizierten Erythrocyten. Die Erythrocyten werden ungleich groß. Bei den Parasiten verschwindet zunächst das Blaue des Plasmas, gleichzeitig lockert sich das Chromatingerüst des Kernes auf und beginnt, vom Rande her aufzufasern, dann kernig zu zerfallen.

In der Subculturröhre 6 ist Bakterienwachstum eingetreten, dagegen ist in der Subculturröhre 7 einwandfrei ein Merozoit festgestellt worden. Dieser ist im Begriffe, in einen Erythrocyten einzudringen, das Plasma, das vorangeht, hat sich dem roten Blutkörperchen bereits angelegt. Trotz

genauen Suchens fand sich nur dieser eine Parasit. Auch Degenerationsformen, Pigmenthaufen oder pigmentführende Leukocyten wurden nicht gefunden.

Andere Subculturversuche ergaben ebenfalls keine besseren Erfolge.

III. Teil.

1. Der Dextrosezusatz zu Malariaparasitenkulturen.
2. Die Frage der Antikörperbildung bei Malaria.
3. Degenerationserscheinungen der Kulturparasiten.
4. Die Kultivierbarkeit der Malariaparasiten in einer oder mehreren Generationen.
5. Geschlechtliche und ungeschlechtliche Formen.

Einen Wendepunkt in der Frage der Kultivierbarkeit der Erreger der Malariaerkrankungen brachten die Veröffentlichungen von Bass. Bis zu dieser Zeit hatten sich die Bearbeiter dieser Frage der allerverschiedensten Versuchsanordnungen bedient, hinfürder verwenden alle den von Bass in die Versuchsanordnung eingeführten Dextrosezusatz. Ich habe zu Vergleichszwecken bei Kulturversuchen einen Teil der Röhren nur mit Dextrosezusatz beschickt, einen andern Teil ohne Dextrosezusatz unter sonst gleichen Bedingungen gehalten. In den Kulturröhren ohne Dextrosezusatz blieben die Schizonten auf ihrer Wachstumsstufe stehen oder entwickelten sich nur wenig weiter im Gegensatz zu den Schizonten, die sich in mit 50 % Dextroselösung versetzten Kulturblut gut weiterentwickelten. Nur einmal fand ich ohne Dextrosezusatz eine Weiterentwicklung ursprünglich $^1/_2$—$^2/_3$ Erythrocytengroßer Schizonten bis zur Sporulation. Die Morulaformen zeigten allerdings Degenerationserscheinungen. Ein nach 29 $^1/_2$ stündiger Kulturzeit aufgefundener jüngster Schizont zeigt zwar keine Degenerationserscheinungen, ist aber wohl ein auf gleicher Entwicklungsstufe stehengebliebener Schizont und wohl kaum ein aus der „in vitro“ stattgehabten Sporulation hervorgegangener Parasit. Ziemann, Bass, da Rocha-Lima und Werner konnten ebenfalls ohne Dextrosezusatz zur Kulturflüssigkeit keine wesentliche Weiterentwicklung erzielen.

Physiologischer Weise findet sich die Dextrose zu 0.08% im Blute des Menschen. Dieser Traubenzuckergehalt ist nach H. Tachan (Nr. 55) nur geringen Schwankungen unterworfen, selbst wenn große Zuckermengen peros zugeführt werden. Der Blutzuckergehalt ist abhängig von der Speicherungsfähigkeit der Leber für Glykogen, dem Polysacharid des Traubenzuckers. Schon durch Fieber kann diese Leberfunktion gestört werden, es kommt dann zu Hyperglykämien nach den Mahlzeiten. Da die Hyperglykämie bis zu 2 und mehr Stunden anhält, ist damit die Forderung Bass erklärt, die Blutentnahme zu Kulturzwecken „einige Stunden nach einer Mahlzeit" vorzunehmen. Nun könnte man vermuten, daß sich die geringfügige Differenz des Blutzuckergehaltes während eines Hungerzustandes und nach dem Essen, die nur einen Bruchteil der Dextrosemenge beträgt, die nach der Blutentnahme dem Patientenblut hinzugefügt wird, durch Mehrhinzugabe ausgleichen ließe. Diese Frage hat Bass untersucht und gefunden, daß wenn das zu Kulturzwecken bestimmte Blut nach einer Fastenzeit des Patienten entnommen wurde, trotz Hinzufügens einer entsprechend größeren Dextrosemenge sofort nach der Blutentnahme es nicht gelang, eine Weiterentwicklung zu erzielen.

Licht in diese Fragen bringen Tachan's Untersuchungen. Er fand im Blutplasma im Hungerzustand bis zu 10% höhere Zuckerwerte als im Gesamtblute. Einige Zeit nach einer Mahlzeit hingegen enthalten die roten Blutkörperchen verhältnismäßig mehr Zucker. Diese Beobachtung läßt sich damit erklären, daß die Erythrocyten die Dextrose langsam speichern und langsam wieder an das Blutplasma abgeben. Der relativ geringe Zuckergehalt der Erythrocyten ist die Ursache, daß die Kulturversuche in dem Blute, das im Hungerzustand vom Patienten entnommen wird, fehlschlagen.

Die Wirkung der Dextrose ist demnach nicht nur als eine rein mechanische Klebewirkung, die den Merozoiten das Festhaften an Erythrocyten erleichtert, wie sie sich

Ziemann dachte, zu erklären. Nach Bass hält vielleicht die Dextrose durch Beeinflussung der osmotischen Verhältnisse, den Parasiten schädliche Substanzen des Blutserums vom Eindringen in die Erythrocyten zurück.

Ob andern Zuckerarten gleich günstige Wirkungen auf Malariaparasitenkulturen zukommen, haben Bass, Perekropoff und andere untersucht. Sie fanden, daß nur Maltose, das Disacharid der Dextrose, gleichgünstig wie Dextrose auf die Kultur einwirkt.

Was die zugesetzte Dextrosemenge anbetrifft, so schwankt sie bei den einzelnen Untersuchern erheblich. Ich setzte nach dem Vorschlage von Bass zu je 5 ccm Blutflüssigkeit 0,1 ccm der 50 % igen Dextroselösung hinzu. Die Dextrose entstammte der Fabrik von Merck oder Kahlbaum. Andere Untersucher wie z. B. Perekropoff haben erheblich größere Dextrosemengen den Kulturmedien hinzugefügt, immer aber in der Form der 50 % igen Dextroselösung, um möglichst wenig an den physiologischen Volumverhältnissen zu ändern.

An Hand meiner Kulturversuche erwies sich, daß der Dextrosezusatz zur Kulturflüssigkeit die Aussichten eines Gelingens stark hebt. Es kam ja wohl auch in einem Einzelfalle zur Sporulation „in vitro“ ohne Dextrosezusatz, jedoch nur in höchst unvollkommner Weise.

Noch eine andere Frage haben Bass Veröffentlichungen aufgerollt: Die Frage der Bildung von Antikörpern im Blute von Malariakranken und die Art ihrer Vernichtung in den Kulturmedien.

Hartmann und Schilling nehmen an, daß die Fiebersteigerung im Anfalle durch ausgeschiedene Toxine, die aber nicht zur Antikörperbildung führen, verursacht wird. Auch Ziemann glaubt an die Bildung von Toxinen, die keine deutliche Antitoxinbildung anregen. Eine Bildung von parasitiziden Stoffen dagegen findet nach Ziemanns Meinung dennoch statt. Bei Rekurrens ist es übrigens angeblich bereits gelungen, parasitolytische Antikörper nach-

zuweisen, ebenfalls bei Trypanosoma brucei Praecipitine durch Mayer, Agglutinine durch Lange. Die Komplementbindung gelang Swellengrebel bei der chronischen Malariaerkrankung nachzuweisen. Schwieriger war der Nachweis bei Neuerkrankungen zu erbringen. Durch diese Untersuchungen ist die Bildung specifischer Reaktionskörper im Malaria infizierten Körper festgestellt, auch, daß sie zu den Receptoren III. Ordnung in dem Ehrlichschen System gehören.

Indem auch Bass die Bildung solcher Amboceptoren annimmt, sucht er deren schädigenden Einfluß auf die im Kulturblut vorhandenen Parasiten dadurch hintanzuhalten, daß er das Complement durch Erhitzen des Blutserums auf 40° C. während einer halben Stunde vernichtet. E. Cathoire (Nr. 12) stellte Komplementschwund im Malariafieberanfalle fest und nahm an, daß dies durch die erhöhte Körpertemperatur veranlaßt würde. Auch durch Ziemanns Beobachtungen werden die Basschen Theorien gestützt. Ziemann schreibt dem inaktivierten Serum bei Malariaparasitenkulturen eine weniger deletäre Wirkung zu als dem nicht inaktivierten Serum.

Ich habe bei meinen Untersuchungen das Blutserum nicht inaktiviert, jedoch die Kulturröhren möglichst bald nach der Blutentnahme in den Brutschrank verbracht. Eine Weiterentwicklung bis zur Sporulation konnte ich feststellen. Ueber die Sporulation hinaus konnte ich keine einwandfreie Weiterentwicklung erzielen, mit Schuld hieran tragen die Leukocyten, die von Malariaparasiten befallene Erythrocyten, phagocytierten. Diese Phagocytose wurde von allen Untersuchern bestätigt, Plehn hat diese Feststellung bereits 1890 gemacht. Auch J. G. Thomson und D. Thomson geben zu, daß die Leukocyten einen Teil der Parasiten, bei weitem jedoch nicht alle, zerstören. Sie entfernten deshalb die Leukocyten nicht und glauben trotzdem die Malariaparasiten bis in die 4. Generation kultiviert zu haben.

Obgleich ich ebenfalls in meinen Versuchen die Phago-

cytose fand habe ich die Leukocyten nicht aus dem Kulturblut entfernt, weil sie, im Vergleich zu der Gesamtzahl der Parasiten, nur einen verschwindenden Teil dieser Parasiten vernichtete. Centrifugiert wurde ein Teil der Kulturröhren zu dem Zwecke der Feststellung des Verhaltens der Leukocyten. Die Zeit der Blutentnahme wurde verändert gewählt in Beziehung zur letzten Nahrungsaufnahme. Bass schlug, wie bereits erwähnt wurde vor, das Blut einige Zeit nach einer Nahrungsaufnahme zu entnehmen. Dagegen spricht, daß zu dieser Zeit eine Hyperleukocytose physiologisch ist.

Besondere Aufmerksamkeit widmete ich der Feststellung der verschiedensten Degenerationsanzeichen, um hierdurch in die Lage zu gelangen, den Fortschritt in der Entwicklung, den beginnenden Stillstand, den Beginn des Zugrundegehens, das Alter der vorgefundenen Parasiten n. a. mehr beurteilen zu können.

Von den Degenerationserscheinungen macht sich zuerst das Abblassen des Parasitenplasmas in den nach Romanowsky-Giemsa gefärbten Blutpräparaten geltend. Bei größeren Schizonten hat es den Anschein, als ob es sich von der Peripherie der Erythrocyten schrumpfend zurückzöge. In andern Fällen fand ich eine mehrfache Vakuolenbildung.

In Kulturen, denen Natr. citricum zugesetzt war, gingen Erythrocyten unter Größenzunahme (Quellungserscheinungen) zu Grunde.

Im Gegensatz zur frühzeitig eintretenden Degeneration des Parasitenprotoplasmas, halten sich die Kerne länger. Wenn bereits das Protoplasma vollständig verschwunden ist, zeigen diese oft noch keinerlei Veränderung. Die Degeneration beginnt in Gestalt der Chromatinauflockerung. Es macht manchmal den Eindruck, als ob der Kern vom Rande her aufzufasern beginne unter gleichzeitiger Größenzunahme. Später stellt sich ein körniger Zerfall ein. Die Färbung, die normalerweise eine karmoisinrote bis tief dunkelrote war, blaßt mehr und mehr ab. Am längsten hält sich das Pigment.

Von den Degenerationserscheinungeu werden, mit Ausnahme der Gameten, alle Entwicklungsstadien gleichmäßig betroffen.

Diese Zerfallserscheinungen setzten in meinen Kulturversuchen in ganz besonderem Maße nach der „in vitro“ stattgehabten Sporulation ein. Die noch nach langer Zeit in dem Kulturblut beobachteten Merozoiten, waren meines Erachtens von solchen degenerativen Processen verschont gebliebene, nicht etwa in 2. Generation entstandene Parasiten, sie waren nur selten auffindbar.

Im Jahre 1890 war, wie bereits erwähnt wurde, die Feststellung, daß sich die Erreger der menschlichen Malariaerkrankuugen außerhalb des Organismus am Leben erhalten lassen, Sacharoff und Plehn gelungen. Wenn auch Nachuntersuchungen Ziemanns mit Plehns Technik resultatlos verliefen, so hat doch Plehn Beobachtungen mitgeteilt, unter anderem über die Phagocytose, über die Einwirkung von Belichtung auf die Lebensfähigkeit der Parasiten, die von andern Forschern später bestätigt wurden. Ergebnislos hingegen verliefen Nachuntersuchungen Sacharoffs, die sich auf die Beobachtungen von Cornado (Nr. 14) bezogen, daß man Malariaparasiten aus dem Wasser heranzüchten könne.

Wenn auch Ziemanns erste Kultiverungsversuche mißlangen, so wurden dabei doch Beobachtungen gemacht, die später von anderer Seite Bestätigung fanden, z. B. die Feststellung, daß sich die Parasiten der tropischen Malariaform unter ungünstigen Bedingungen von allen Malariaparasitenformen am längsten am Leben erhalten ließen.

Wie Nocht (34) so fanden auch J. G. Thomson und D. Thomson im Blute eines an comatöser Malaria Verstorbenen zahlreiche Teilungsformen. In einem andern Falle stellten sie jedoch im Gegensatz zu Nocht, der im Sektionsblut nur Teilungsformen gefunden, und diese Erscheinung für eine postmortale Weiterentwicklung der ursprünglich vorhandenen verschiedensten Parasitenentwicklungsstadien erklärt hatte, fest, daß sich im Leichenblut alle Ent-

wicklungsphasen fanden. Nach Nocht soll erst 24 Stunden nach dem Tode die Weiterentwicklung bis zu den Sporulationsformen beendet sein. J. G. Thomson und G. Thomson geben leider nicht an, in welcher Zeit nach dem Eintritt des Todes in ihrem letzten Falle die Sektion und Blutuntersuchung stattfand. Ich glaube, einmal im Blute eines an Typhus Verstorbenen, der ebenfalls an Malaria tertiana gelitten hatte, und dessen Sektion 24 Stunden nach Eintritt des Todes stattfand, einen jugendlichen Schizonten gesehen zu haben. Leider war die Färbung des Präparates keine gute.

Mit Hülfe der von Bass mitgeteilten Technik ist es diesem und seinen Mitarbeitern angeblich gelungen, 29 mal den Erreger der Malaria tropica Erkrankung, einmal den Erreger der Malaria quartana und 6 mal den Tertianparasiten erfolgreich zu kultivieren. Die an Ziemann übersandten Bassschen Kulturpräparate bringen Entwicklungsstadien zur Ansicht, die im peripheren Blute eines Malaria tropica-Kranken nicht gefunden werden, die somit in der Kultur entstanden sein müssen. Es sind dies die Sporulationsformen der Malaria tropica-Erkrankung. Dadurch ist der Beweis erbracht, daß eine Weiterentwicklung „in vitro“ stattgefunden hat. Bestätigt wurden diese Beobachtungen von Nachuntersuchern an Hand eigener Kulturversuche. Dahingegen wurde Bass Angabe, den Malariaparasiten in mehrfacher Generation kultiviert zu haben, kritisch untersucht und ablehnend beurteilt von da Rocha-Lima, Werner, Schilling und von andern mehr. Diese halten die von Bass und von Ziemann beobachteten Parasitenformen die das Gelingen der Kulturversuche in mehrfacher Generation beweisen sollten, nicht für Formen, die in der Kultur entstanden sind, sondern für Parasiten, die bereits zur Zeit der Kulturanlage vorhanden waren und sich lange in dem Kulturblut unverändert hielten. Aus der Literatur kann man in der Tat ersehen, daß sich Malariaparasiten außerordentlich lange, besonders unter Anwendung von niederen Tempe-

raturen tagelang, scheinbar unverändert in Kulturflüssigkeiten halten ließen. Bei Eisschranktemperatur wurden nach 120 Stunden Kulturzeit noch Lebensvorgänge an den Parasiten beobachtet.

Den Zweifeln der Kritiker muß ich auf Grund eigener Beobachtungen beipflichten. Ich habe in meinen Kulturversuchen ebenfalls noch nach der in vitro eingetretenen Sporulation Merozoiten beobachtet, die, scheinbar morphologisch unverändert, gerade im Begriffe waren, in neue Blutkörperchen einzudringen, weil es sich aber nur immer um Einzelbeobachtungen handelte, die prozentuale Feststellung aller vorhandenen Parasitenstadien deshalb unmöglich war, stellen solche Beobachtungen keinen zwingenden Beweis dafür dar, daß tatsächlich die Malariaparasitenkultur in mehrfacher Generation gelungen ist. Auch das Auftreten von Parasiten einer bestimmten Entwicklungsphase in größerer Anzahl beweist nicht ohne weiteres, daß sich die Parasiten in der Kultur gebildet haben. Das Entwicklungstempo der Parasiten ist ein sehr verschiedenes in der Kultur, es vollzieht sich ein Entwicklungscyklus von Sporulation bis zur nächsten Sporulation nicht in der, uns von Beobachtungen am Patientenblut her bekannten, Zeit von etwa 48 Stunden bei Malaria tertiana. Während schon gewisse Schwankungen bei dem Malariakranken (anteponierende nnd postponierende Fieberanfälle) beobachtet werden, wurde in Kulturversuchen von verschiedenen Untersuchern eine ganz erhebliche, von der angewandten Brutofentemperatur abhängige, Differenz der Entwicklungszeiten festgestellt. Bass fand z. B. bei einer Brutofentemperatur von 40° C. nach 36 Stunden den Beginn der Sporulation. Da Rocha-Lima und Werner fanden bereits nach 24 Stundeu Kulturzeit, unter Anwendung der gleichen Brutofentemp. wie Bass, Teilungsformen, J. G. Thomson un Mc. Lelan stellten bei 39° C. zwischen 24 und 32 Stunden, Gurko und Hamburger bei 39° C. die Segmentation nach 24 Stunden fest. Ziemann fand bei 37° Brutofentemperatur den Eintritt der Sporulation

nach 40—48 Stunden, bei 29,5° C. bei 34—36 Stunden, Perekopoff bei 41° C. in seinen Malaria tropica-Kulturen diesen Eintritt der Sporulation nach 43 Stunden.

Noch weniger lassen sich Rückschlüsse machen in Fällen, in denen Blut von chronisch Malaria-Kranken zu Kulturzwecken entnommen wurde. In diesen Fällen sind so ziemlich alle Entwicklungsstadien im Patientenblut vertreten. Eine Weiterentwicklung der Parasiten in der Kulturflüssigkeit läßt sich hier nur durch die prozentuale Auszählung beweisen. Was für die chronische Malaria und die Spätanfälle von Erstlingsmalaria gilt, trifft ganz besonders auf Mehrfachinfektionen zu.

Es gibt zwei Wege, auf denen der Beweis für an Kulturversuchen gemachte Beobachtungen erbracht werden kann:

1) Die Feststellung morphologischer Veränderungen der Kulturparasiten,
2) Zahlenverhältnisse.

Die morphologischen Verhältnisse der Kulturparasiten sind heute noch nicht als beweisend heranziehbar. Die zumeist bei Malariaparasitenuntersuchungen angewandte Färbetechnik nach Giemsa ist kompliziert und in den so gefärbten Präparaten ist es nicht mit Sicherheit möglich, zu entscheiden, ob z. B. ein einzelner, im Kulturblut aufgefundener Merozoit sein Dasein der letzten, vielleicht in vitro eingetretenen Sporulation verdankt, oder ob er sich schon zur Zeit der Kulturanlage im Blute befand und sich nachher nicht offensichtlich verändert hat. Nur bei vorhandenen groben Veränderungen, z. B. Abblassen oder Fehlen des blau gefärbten Plasmas, kann man heute einen solchen Merozoiten als Degenerationsform ansprechen.

Genaue Zahlenangaben dagegen sind beweisend. Die Arten, zu solchen zu gelangen, wurden bereits erörtert.

Einen besonders wertvollen Beitrag zur Klärung der Frage der Kultivierbarkeit der Malariaparasiten lieferten da Rocha-Lima und H. Werner (Nr. 43). An Hand exacter Beobachtungen, die sie in Form von Verhältniszahlen mit-

teilen, beweisen sie als erste hierdurch die „in vitro“ stattgehabte Weiterentwicklung der Kulturparasiten bis zu deren Sporulation. Auch sie beobachteten in ihren Kulturmedien Parasiten, auf Grund deren Vorhandensein Bass, Ziemann und Andere eine gelungene Kultivierung in mehrfacher Generation annahmen. Im Gegensatz hterzu halten sie diese Parasitenformen für in der Entwicklung stehengebliebene, langsam der Degeneration verfallende Plasmodien. Ich habe In meinen Kulturversuchen ebenfalls solche Parasiten, die eine Züchtung in mehreren Generationen vortäuschen könnten, beobachtet. Auch Edm. und Et. Sergent, Béquet und Plautier weisen auf die Möglichkeit hin, daß Jungformen von Kulturparasiten, die, ohne sich weiter zu entwickeln und ohne sichtbar zu degenerieren, auf derselben Entwicklungsstufe für längere Zeit stehenbleiben, ein „vie relative“ führen, und so leicht zu der irrtümlichen Annahme verleiten, daß es sich um Parasiten einer neuen, in der Kultur gezüchteten, Generation handelt.

Um daher ihre Beobachtungen zu beweisen, bedienten sich J. G. Thomson und Fautham der von mir ebenfalls angewandten Auszählmethode in Procenten. In den Fällen, in denen sie diese Methode nicht anwandten, sind die bereits gemachten Einwendungen ebenfalls zu erheben. Insbesondere scheinen mir Zweifel gegenüber der angeblich bis zur 4. Generation gelungenen Tropicaparasitenkultur am Platze zu sein. Die 6 Tage alten Sporulationsformen sind meines Erachtens Degenerationsformen, die Merozoiten sind ungleich groß, das Chromatin sowohl als auch das Merozoitenplasma.

Auch Ziemann erbringt keinen zwingenden Beweis für die Richtigkeit seiner Annahme, daß ihm die Züchtung der Malariaparasiten in mehrfacher Generation gelungen ist. Ziemanns Feststellung gegenüber, daß von ihm beobachtete Jungformen einer in der Kultur gezüchteten Generation angehört haben müßten, weil die Parasiten der ersten Generation degeneriert wären und eine solche Degeneration immer alle Parasitenstadien gleichmäßig beträfe, will ich auf Beobach-

tungen Pitschugins hinweisen. Dieser fand angeblich eine Degeneration nur bestimmter, in gewissen Entwicklungsphasen befindlicher Parasiten. Allgemein wurde ebenfalls festgestellt, daß Gameten relativ resistender gegenüber Schädigungen sind, als andre Parasitenstadien. Auch Ziemanns Angabe, daß die Parasitenzahl im Gegensatz zum peripheren Blut eine größere in der Kultur gewesen sei, bedeutet nicht ohne weiteres, daß es sich deshalb um eine Vermehrung handelt. Diese Erscheinung kann damit zusammenhängen, daß sich die Parasiten in gewissen Schichten einer Kulturröhre zusammendrängen. Das Vorkommen von Agglutinationserscheinungen der mit Malaria-tropica-parasiten infizierten Erythrocyten zur Zeit der Sporulation erschwert die Beurteilung dieser Verhältnisse. Mehrfachinfektion von Erythrocyten, die, im Gegensatz zum peripheren Blut, in dem Kulturblut von Ziemann beobachtet wurde, habe ich des öfteren auch im Patientenblut gefunden. Pitschugins Beobachtung einer häufigeren Mehrfachinfektion im Kulturblut als im Patientenblut, spricht allerdings für Ziemanns Auffassung, daß dieser Vorgang als Zeichen einer Fortentwicklung in der Kultur anfzufassen ist.

Zweifel, wie sie den Deutungen von Ziemanns und Bass' Beobachtungen entgegengebracht wurden, müssen auch gegenüber ähnlichen Deutungen geltend gemacht werden. So glauben auch Gurko und Hamburger die Malariaparasiten bis in die 3. Generation gezüchtet zu haben, sie, wie auch J. G. Thomson, V. Thomson, Pepper, Miller, Perekropoff und Pitschugin erbringen jedoch auch nicht den einwandfreien Beweis der Richtigkeit ihrer Schlußfolgerungen.

Die meisten Untersucher haben sich nur der Frage der Kultivierung der ungeschlechtlichen Entwicklungsreihe der Malariaparasiten gewidmet, Bass hat ausdrücklich betont, daß er keine Andeutung einer Konjugation beobachtet habe. Joukoff (Nr. 23) dagegen behauptet, den ganzen Cyklus der geschlechtlichen Fortpflanzung in seinen Kulturversuchen

beobachtet zu haben und zwar in jenen Kulturröhren, denen er Natriumcitricum als gerinnungshemmende Substanz zugesetzt hatte. Nach seinen Angaben hat er nach der Befruchtung der weiblichen Gameten Ookinetenbildung und Copulationsformen, nach 6 Tagen in seinen Kulturversuchen sogar Sporozoiten beobachtet.

Schaudinn (49) berichtet ebenfalls, daß er das Eindringen von Sporozoitnn in Erythrocyten und deren weitere Umwandlung in Schizonten unter dem Mikroskop beobachtet habe.

Schaudinns Beobachtung wird von Perekropoff (38) bestätigt, der in 48 stündiger Kultur den gleichen Vorgang, den Schaudinn mitteilte, gesehen haben will. Dieser Verfasser beruft sich außerdem auf Plehn und Maurer, die auch die Entwicklung von Sporozoiten aus Gameten im Blutkreislauf für möglich erklärt hätten. Perekropoff hält diese angebliche Copulation der Gameten, gemäß der von Glogner aufgestelltcn Hypothese, für die Ursache von Rückfällen bei der Malariaerkrankung. Außerdem glaubt P. die Schizogonie der weiblichen Gameten, die bei Malaria tropica-Parasiten von Neebs im Jahre 1909 und von Swellengrebel ebenfalls erwähnt wurde, beobachtet zu haben.

Andere Untersucher wie Ziemann u. s. w., denen ich mich auf Grund meiner Untersuchungen anschließen muß, haben keine Andeutung einer Parthenogenese der weiblichen Gameten, wie auch keinerlei Anzeichen einer Konjugation in ihren Kulturversuchen gefunden.

N. H. Swellengrebel (Nr. 54) widmete sich ganz besonders eingehend der Untersuchung dieser Frage. Mannaberg, Etting, James, Bates, Hanson und besonders Craig glaubten die Konjugation im Blute beobachtet zu haben. Dem widersprachen Calkins, Doflein, Daederik, Sergent, M. Mayer und Neumann. Letztere hatten wohl ähnliche Beobachtungen wie die erste Gruppe der Untersucher gemacht, kamen jedoch zu anderen Schlußfolgerungen.

Swellengrebel schließt sich diesen letzteren an, indem er nachzuweisen sucht, daß es sich in den fraglichen Fällen nicht um eine intraglobuläre Conjugation, sondern vielmehr um Zerfallsprodukte, möglicherweise um verfrühte Teilungsvorgänge handelt.

Schlußzusammenfassung.

Auf Grund von sechs angestellten Kulturversuchen stellte ich folgende Tatsachen fest:

I. Die Erreger der Malaria tertiana-Erkrankungen lassen sich außerhalb des menschlichen Körpers am Leben erhalten, sie lassen bei bestimmter Versuchsanordnung eine Weiterentwicklung bis zur Sporulation und Bildung junger, zum Eindringen in Erytrocyten befähigter Parasiten, erkennen.

II. Eine gelungene Kultivierung in vitro in mehrfacher Generation konnte nicht erwiesen werden.

III. Die Parasiten entwickelten sich in dem gleichen Zeitmaß wie die Parasiten des peripheren Blutes, wenn die Brutofentemperatur entsprechend der Körpertemperatur des Patienten eingestellt wurde.

IV. Die bei Kulturversuchen von Malaria tropica-Parasiten beobachtete Zusammenklumpung parasiteninfizierter Erythrocyten zur Zeit der Teilung fand sich bei Versuchen mit dem Erreger der Malaria tertiana-Erkrankung nicht.

V. Eine Ueberwanderuug der Malariaparasiten von einem zu einem andern Erythrocyten wurde nicht beobachtet.

VI. Wenn auch ohne Dextrosezusatz eine Weiterentwicklung der Kulturparasiten, in einem Falle bis zur Sporulation beobachtet wurde, so erwies sich der Dextrosezusatz als starkes Begünstigungsmittel.

VII. Dem Chinin hingegen kommen stark hemmende Einflüsse zu. Hatten Patienten vor der Blutentnahme Chinin. hydrochlor. in therapeutischen Dosen genommen, so mißlangen die Kulturversuche.

IV. Während alle Entwicklungsstadien gleichmäßig von Degenerationsvorgängen betroffen wurden, zeigten die Gameten schädigenden Einflüssen gegenüber eine größere Resistenz.

Literatur.

1. *L. Ambrose*, The first Expedition from the Tulane Universit. School of Tropical Medicine to the Tropics for the Study of Malaria. 1912. New Orleans.
2. *C. C. Baß*, A new conception of immunity application to the cultivation of protozoa and bakteria from the blood and to blood and to therapeutic measures. Arch. für Schiffs- & Trop. Hyg. 1912. Bd. 16.
   Journal American Medical Association 1911/VII. S. 1534 p. p.
3. *C. C. Baß*, On the Cultivation of Malariae parasites in vitro by preventing the developpement of complement in the human blood employed.
   Journal of Tropical Medicine & Hygiene Bd. 14 vom 15. XI. 1911.
4. *C. C. Baß & F. M. Johns*, The Cultivation of Malarial Plasmodia (Pl. vivax, Pl. falciparum) in vitro.
   Journal of Experiment. Medicine 1912. X. Bd. 16.
5. *C. C. Baß*, Sucessfull Cultivation of Malarial Plasmodia.
   Journ. Am. Med. Ass. 1912.
6. *C. C. Baß*, Cultivation of Malarial Plasmodia in vitro. American of tropical deseases and preventive medicine. Vol. 1. 1913.
7. *M. Béguet*, Unter E. Sergent.
8. *J. Bequart*, Unter J. Rodhain.
9. *Biedl*, Wiener Kl. Wochenschrift 1917. Nr. 14—17.
10. *A. Bignami*, Unter E. Marchiafava.
11. *Blumer*, Aufgeführt von Baß & S. Thayer.
12. *E. Cathoire*, Baisse du pouvoir alexique du serum dans l'acees paludéen. Cr. Soc. Biolog. Bd. 69. S. 562. Arch. f. Schiffs & Trop. Hyg. Bd. 16. S. 870.
13. *A. Celli*, Die Malaria nach den neuesten Forschungen. Urban & Schwarzenberg 1913.
14. *T. V. Coronado*, Reproduction del hematozoario di Laveran. Chronica med. quirurg de la Habana Bd. 17, S. 280. Bd, 19.

15. *T. Mc. Craig*, Ossler & Crae. A System of Medicine. London 1907. Bd. 1, S. 408.
16. *H. B. Fautham,* Unter J. G. Thomson.
17. *A. Gasbarrini*, Das Bordet-Gengousche Phaenomen (Komplementablenkung) bei Malaria. Ztschr. f. Journa. Forschg. 1913. B. 20. H. 1/2.
18. *Gabbi,* Erwähnt bei Ziemann.
19. *J. Gordon*, Unter J. G. Thomsom.
20. *A. G. Gurko* & K. E. Hamburger. Zur Frage über die Kultur des Plasmodiums der tropischen Malaria nach Baß & Johns. Separatabdruck aus der Zeitschrift für Hygiene & Infektionskrankheiten 1913 (Med. Obosrenije 1913 Nr. 4).
21. *Hamburger*, Unter A. G. Gurko.
22. *Johns*, Unter Baß.
23. *N. M. Joukoff*, Culture de Parasite de la Malaria. Compt. Rend. Soc. Biol. Bd. 74 1913. Nr. 3.
24. *N. M. Schukow,* Unter Joukoff.
25. *Kubassow*, Ueber die Pilze des Paludismus. 1895.
26. *A. Laveran*, Traité du Paludisme. 1898.
27. *C. H. Lavinder,* Note on the cultivation of Malarial Plasmodia after the Method of Baß and Johns. Journal. Am. Med. Ass. Bd. 60. Nr. 1. 1913.
28. *Mc. Lellan*, Unter J. G. Thomson.
29. *Levi della Vida*, Referat in Malaria e Mallatti 1914. Fasc II. S. 144.
30. *E. Marchiafava* und A. Bignami. The Parasites of Malarial Fevers translated by J. H. Thomsom. London 1894.
31. *E. Martini*, Ueber die Entwicklung von Malariaparasiten im Baßschen Nährboden. Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten. Orig. Bd. 74. Heft 3/4, S. 250—254.
32. *Miller*, Erwähnt von A. Laveran.
33. *Mitchel*, Erwähnt von Baß & von Thayer.
34. *B. Nocht*, Bemerkungen zu der Arbeit von Prof. Ziemann: „Weiteres über die Züchtung der Malariaparasiten und der Piroplasmen in vitro". Archiv f. Schiffs- u. Trop. Hyg. Bd. 18 H. 5. S. 166.
35. *Olpp*, Die Reinkultur der Malariaparasiten nach Baß & Johns. Münch. med. Wochenschrift 1912, S. 2623—2625.
36. *Wi. Ossler,* Unter Craig.
37. *O. H. Pepper* & J. G. Miller: The cultivation of the Plasmodium falciparum in vitro. Proc. Path. Soc. Philad. Vol. 16.

38. *J. G. Perekropoff,* Ueber Kulturen der Plasmodien des tropischen Fiebers (Malaria tropica). Archiv für Protistenkunde. Vol. 35 N. 2. S. 139.
39. *Pewny,* Ueber Parasitolysine bei Malaria. Archiv für Schiffs- und Tr. Hyg. 1918, Bd. 22, H. 10.
40. *J. Pitschugin,* Kultivierungsversuche mit Plasmodium vivax nach der Methode von Baß. Zentraiblatt für Bakteriolog. und Infektionskrankheiten. Orig. Bd. 73. H. 6, S. 373.
41. *A. Plantier,* Unter E. Sergent.
42. *F. Plehn,* Malariastudien, Berlin 1890.
43. *H. da Rocha-Lima* und Werner: Ueber die Züchtung von Malariaparasiten nach der Methode von Baß. Arch. f. Schiffs- u. Trop. Hygiene Bd. 17, 1913. H. N. 16.
44. *Rodenwaldt,* Immunität gegen Malaria bei Negern. Arch. für Schiffs- u. Trop. H. Bd. 18, S. 253.
45. *J. Rodhain,* J. Vanderbranden, J. Bequart: Contribution au mécanisme de la transmission des trypanssomes par les glossines. Arch. f. Schiffs- u. Trop. Hygiene H. 16. S. 732.
46. *R. Roß,* Unter J. G. Thomson.
47. *Rosenbach,* Erwähnt von Thayer.
48. *M. Rowly-Lawson,* The cause of malariae anemia and the intra vascular migrations of the malariae parasite. Archiv of intern. med. 1912. S. 420—444.
49. *Sacharoff,* Ueber den Einfluß der Kälte auf die Lebensfähigkeit der Mal. Parasiten. Centralbl. f. Bakt. Bd. 15, p. 188.
49a. *F. Schaudium,* Studien über krankheitserregende Protozoen. Arbeiten aus d. Kais. Ges. Amt, Bd. 19.
50. *C. Schilling* und M. Hartmann: Die pathogenen Protozoen. Berlin 1917.
51. *N. M. Schukow,* Unter Joukoff.
52. *Ed. Sergent,* Edm. und E. Sergent, M. Béguet, A. Plantier: Sur la culture „in „vitro" du Parasite du Paludisme d'après la methode de Baß. Societé de biologie. Séance 1913. 25. X.
53. *J. A. Sinton,* Some attempts at the cultivation of the malarial parasite by Baß' Method. Annals of tropical Med. and Parasitologie. 18. XII. 1912.
54. *N. H. Swellengrebel,* Schizogonie der weiblichen Gametocyten von Laverania malariae (Tropicaparasiten). Zentralblatt für Bakt. Orig, Bd. 70 H. 3/4 1913.
55. *H. Tachan,* Ueber den Zuckergehalt des Blutes. Deutsche med. Wochenschrift 1913, S. 686 pp.
56. *W. S. Thayer,* Lektures on the Malarial fevers. New York. 1901.

57. *J. G. Thomson & Mc. Lellan,* The cultivation of one Generation of Malarial Parasites (Plasm. falciparum) in vitro, by Baß' Method. Am. Trop. Med. and Parasitology Bd. 16 1912.
58. *D. Thomson*, A Research into the Production Life and Death of Crescents in Malignant Tertian Malaria, in treated and untreated cases, by an Enumerative Method. Am. Trop. Med. and Parasitology V pp 57—82, 1911.
59. *J. G. Thomson & D. Thomson* und H. B. Fautham The cultivation of one generation of benign Tertian Malarial Parasites (Plasm. vivax) in vitro, by Baß's Method. Ann. of Trop. med. and Pares. 1913, Bd. VII.
60. *J. G. Thomson & D. Thomson,* The growth and sporulation of the benign and malignant tertians malarial parasites in the culture Tube and in the human host. Ann. of Trop. Med. and Parasitol. 1913, Bd. 7, N. 4.
61. *Waldstein*, Leukocytose und Malaria. Berliner klin. Wochenschrift 1895 IV.
62. *H. Ziemann,* Ueber Malaria und andere Blutparasiten. Jena 1898
63. *H. Ziemann,* Ueber die Baß'sche Kultur der Malariaparasiten in vitro und die daraus sich ergebenden Resultate. Centralblatt für Bakteriologie. Orig. 1913, Bd. 67.
64. *H. Ziemann*, Ueber die Kultur der Malariaparasiten und der Piroplasmen in vitro. Archiv für Schiffs- und Tropenhyg. Bd. 17.
65. *H. Ziemann,* Ueber die künstliche Weiterentwicklung (in vitro) der Tertian Malariaparasiten. Deutsche med. Wochenschrift N. 6 und 7. Nachtrag hierzu. Deutsche med. W. N. 8.
66. *H. Ziemann,* Weiteres über die Züchtung der Malariaparasiten und der Piroplasmen (Piroplasma canis) in vitro. Archiv f. Schiffs- und Trop. Hyg. Bd. 18, N. 3, S. 77.
67. *H. Ziemann,* Nachtrag zu „Weiteres über . . ." Archiv f. Schiffs- und Trop. Hyg. Bd. 18. H. 4, S. 132.
68. *H. Ziemann,* V. Band von Menses Handbuch der Tropenkrankheiten 1917.

Lebenslauf.

Geboren zu Biedenkopf in Hessen-Nassau am 23. 6. 1891 als Sohn des Fabrikanten *August Brandt* und seiner Ehefrau *Emma*, geb. Binzer, evgl. besuchte ich zuerst die Elementarschule, später das Realprogymnasium meiner Vaterstadt. Die Reifeprüfung legte ich 1910 an der Oberrealschule zu Marburg a. d. Lahn ab.

Ich widmete mich dann dem Studium der Medizin, zunächst in Marburg a. d. Lahn und bestand hier die ärztl. Vorprüfung am 8. August 1912. Nachdem ich ein Semester an der Königlichen Universität München studiert hatte, kehrte ich nach Marburg zurück und studierte hier bis zum Beginn des Krieges. Meine Staatsprüfung bestand ich in Marburg am 18. März 1915.

Meine akademischen Lehrer waren:

In Marburg: Geh. Reg. Rat Prof. Dr. *Zincke*, *Mannkopf*, *Mayer*, *Richarz*, *Korschelt*, *Schenck*, *Gasser*, *Tuczek*, Prof. Dr. *Disse*, *Lohmann*, *Fries*, *Kutscher*.

In München: Prof. Dr. *Ritter von Müller*, *v. Pfaundler*, *Posselt*, *Borst*, *Baisch*, *Freytag*.

In Marburg: Prof. Dr. *Zangemeister*, *König*, Geh. Reg. Rat Prof. Dr. *Matthes*, Prof. Dr. *Bielschofsky*, Geh. Reg. Rat Prof. Dr. *Bonhoff*, Prof. Dr. *Jores*, *Jahrmärker*, *Gürber*, *Müller*, *Hohmeier*, *Rieländer*, *Ostmann*, *Hildebrand*.

Im Kriege war ich als Truppenarzt bei mobilen Formationen tätig, zuletzt als Oberarst d. Res. und Regimentsarzt im Dragoner-Rgt. 12. Nach meiner Entlassung im Dezember 1918 habe ich mich als praktischer Arzt in Buchenau, Kreis Biedenkopf, niedergelassen.

Karl Ludwig Julius Brandt.